



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Towards new therapeutic strategies in chondrosarcoma

Schrage, Y.M.

Citation

Schrage, Y. M. (2009, November 5). *Towards new therapeutic strategies in chondrosarcoma*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14327>

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/1887/14327>

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

A dark, grayscale microscopic image of chondrosarcoma cells, showing various cell shapes and structures, including some with prominent nuclei and others with more elongated, spindle-like forms.

**Nieuwe strategieën voor de behandeling
van chondrosarcomen**

Nederlandse samenvatting

Inhoud

Chondrosarcomen: entiteit, gradering, behandeling en prognose

Benigne versus maligne kraakbeenvormende tumoren

Markers om de prognose van chondrosarcomen te voorspellen

Nieuwe strategieën voor de behandeling van chondrosarcomen

Chondrosarcomen: entiteit, gradering, behandeling en prognose

Chondrosarcomen zijn kwaadaardige, kraakbeenvormende tumoren die in of op het bot groeien. In de groep conventionele chondrosarcomen, veruit de grootste groep (85%), wordt onderscheid gemaakt tussen centrale chondrosarcomen, die ontstaan in de mergholte van de lange pijpbeenderen, en de perifere chondrosarcomen, die ontstaan aan het oppervlak van het bot. Naast de conventionele chondrosarcomen, beschreven in dit proefschrift, omvat de groep chondrosarcomen ook zeldzame chondrosarcoom soorten, zoals het clear cell chondrosarcoom, het mesenchymale chondrosarcoom en het gedifferentieerde chondrosarcoom.

Conventionele chondrosarcomen komen voor bij ongeveer 1 op 50.000 personen, bij mannen en vrouwen even vaak. De leeftijd waarop de diagnose chondrosarcoom gesteld wordt, is tussen de 30 en 60 jaar. Chondrosarcomen worden met name aangetroffen in de lange pijpbeenderen (dus vooral in benen en armen) die groeien volgens enchondrale ossificatie, dat wil zeggen, met behulp van een groeischijf. In de groeischijf bevinden zich kraakbeencellen die blijven delen, totdat een individu onder invloed van hormonen aan het einde van de puberteit komt en de groeischijven dichtgaan, oftewel verbenen. De meeste chondrosarcomen worden gevonden in de heupbotten, de bovenbenen, de armen en de ribben.

Van zowel centrale als perifere chondrosarcomen worden ook benigne (goedaardige) voorloperstadia gevonden. Centraal groeiende benigne kraakbeentumoren worden enchondromen genoemd, perifeer groeiende benigne kraakbeentumoren osteochondromen. De kans dat een enchondroom kwaadaardig wordt, en dus verandert naar een chondrosarcoom, wordt geschat op minder dan 1%. In 40% van de centrale chondrosarcomen worden echter resten van een goedaardige voorloper teruggevonden. Ook osteochondromen worden in minder dan 1% kwaadaardig. Perifere chondrosarcomen ontstaan per definitie uit een osteochondroom. Om deze reden worden perifere chondrosarcomen ook wel secundaire chondrosarcomen genoemd.

Conventionele kraakbeentumoren worden meestal als solitaire (enkele) afwijkingen gevonden. Echter, bij zowel perifere als centrale kraakbeentumoren is er een syndroom bekend waarbij meerdere goedaardige kraakbeentumoren voorkomen. Multipele Osteochondromen (MO) betreft een erfelijke ziekte waarbij meerdere osteochondromen ontstaan in combinatie met deformatie van de botten van de armen. MO openbaart zich al op kinderleeftijd en vaak blijven de patiënten klein van gestalte. MO-patiënten hebben een licht verhoogde kans dat de osteochondromen kwaadaardig worden, geschat op 1-3%. Het voorkomen van meerdere enchondromen is zeer zeldzaam en wordt enchondromatosis (EC) genoemd, beter bekend als de ziekte van

Ollier. In tegenstelling tot MO is EC geen erfelijke ziekte. De enchondromen groeien vooral in de handen en voeten, wat tot ernstige disfunctie leidt. EC wordt op zowel kinderleeftijd als bij volwassenen manifest. De kans dat een enchondroom kwaadaardig wordt, is sterk verhoogd bij EC-patiënten, namelijk tot circa 33%.

Chondrosarcomen maken deel uit van een klinisch-pathologisch gedefinieerd spectrum, dat verdeeld wordt in vier groepen: benigne tumoren, graad I chondrosarcomen, graad II chondrosarcomen en graad III chondrosarcomen. De onderverdeling van dit spectrum gebeurt internationaal nog immer aan de hand van de in 1960 door Evans opgestelde criteria. Aan de hand van deze criteria worden behandelplannen opgesteld en de prognose voorspeld. Graad I en II chondrosarcomen geven zelden metastases (0% en 10%), terwijl 71% van de graad III chondrosarcomen metastaseert. De daaraan gerelateerde 5-jaarsoverleving is respectievelijk 83%, 64% en 29% voor graad I, II en III chondrosarcomen. Wat de behandeling betreft, worden enchondromen vaak expectatief vervolgd, tenzij er sprake is van pijn of pathologische fracturen. Bij graad I chondrosarcomen wordt tegenwoordig intralesionale chirurgie toegepast, waarbij zoveel mogelijk tumorweefsel verwijderd wordt en de ontstane holte opgevuld wordt met cement of botchips. Adjuvant worden vaak de randen nabehandeld met fenolisatie of cryochirurgie om de maligne cellen die achtergebleven zijn te doden. Een agressiever beleid wordt gevolgd ten aanzien van de graad II en graad III chondrosarcomen, waarbij en-bloc resectie of soms zelfs amputatie noodzakelijk is.

Vraagstellingen in dit proefschrift

Het onderzoek aan chondrosarcomen beschreven in dit proefschrift is gebaseerd op drie vragen. De eerste vraag die beantwoord werd, is of er moleculaire markers zijn die onderscheid kunnen maken tussen benigne en maligne kraakbeentumoren. De tweede vraag is eenzelfde vraag naar markers die de prognose van kraakbeentumoren kunnen voorspellen, onafhankelijk van subjectieve histologische gradering. Het derde vraagstuk behelst de behandeling van chondrosarcomen en het ontwikkelen van nieuwe strategieën voor medicamenteuze therapie.

Benigne versus maligne kraakbeenvormende tumoren

In **hoofdstuk 2** werd bevestigd dat de criteria voor gradering van chondrosarcomen van Evans relatief subjectief zijn en dus afhankelijk van de patholoog die de gradering uitvoert. Achttien pathologen, geaffilieerd aan Eurobonet, een Europees netwerk waarbinnen de biologie en pathologie van bontumoren wordt bestudeerd, beoordeelden zestien casus. De variabiliteit tussen de beoordelingen bleek ruim te zijn, uitgedrukt in een kappawaarde van 0.78. De concordantie was het kleinst in het onderscheid tussen benigne en graad I chondrosarcomen, namelijk $\kappa=0.54$. In dezelfde studie werden van een grote groep van 20 enchondromen en 37 chondrosarcomen gegevens verzameld, waarvan tien jaar follow-up bekend was en die in een multidisciplinair verband gediagnosticeerd waren, door pathologen, radiologen en chirurgen. Hieruit bleek dat een accurate diagnose gesteld kon worden aan de hand van slechts twee histologische criteria, te weten invangings van pre-existent lamellair bot en mucoïde/myxoïde veranderingen van de extracellulaire matrix. Hiermee werden 54 van de 57 (94.7%) casus juist gediagnosticeerd (sensitiviteit 95% and specificiteit 95%). Wanneer de beslissing op vijf parameters gebaseerd werd, werd slechts één van de 57 gevallen verkeerd gediagnosticeerd. Deze vijf parameters waren: invanging, hoge celrijckdom, open chromatine in de kern, mucoïde/myxoïde degeneratie van de matrix en de leeftijd van de patiënt (ouder dan 45 jaar).

De Indian hedgehog (IHH), WNT en Transforming growth factor β (TGFB) signaaltransductie regelkringen spelen een belangrijke rol in de normale groei en differentiatie van kraakbeencellen in de groeischijf. IHH doet dit via het intracellulair (in de kraakbeencel) gelegen “Smoothed” (SMO) en “Patched” (PTCH), waardoor “Glioblastoma” (GLI) naar de celkern getransporteerd wordt. In de celkern bindt GLI aan het DNA en zorgt er voor dat er weer nieuwe SMO, PTCH en GLI worden afgeschreven waardoor het signaal versterkt wordt (Figuur 1.4). Het gaat uiteindelijk om het signaal dat door deze kraakbeencel via de binding van “parathyroid hormone like hormone” (PTHrP) wordt doorgegeven aan de parathyroid hormoon receptor (PTHrR). PTHrR zorgt er vervolgens voor dat de kraakbeencellen in de prolifererende zone (Figuur 1.3) niet verder differentiëren, waardoor de botten in de lengterichting groeien. Voor het doorgeven van deze signalen door de extracellulaire matrix waarin de kraakbeencellen gelegen zijn, worden de lange eiwit-suikermoleculen gebruikt die in de matrix aanwezig zijn; de zogenoemde heparan sulfaat proteoglycanen (HSPG's). Voor het verlengen van de suikerketens zijn twee genen belangrijk, EXT1 en EXT2. Uit genetische studies weten we dat bij patiënten met MO een van beide EXT-genen gemuteerd is en dus niet of minder goed werkt. Ook in perifere chondrosarcomen die solitair voorkomen, dus niet in verband met de erfelijke ziekte MO, is de expressie van het EXT-gen verminderd vergeleken met de expressie in de normale groeischijf. Interessant genoeg

blijkt de PTHLH signaaltransductiecascade echter niet aangedaan te zijn in hooggradige perifere chondrosarcomen. Gesuggereerd wordt dat er ofwel kraakbeencellen zijn die zelf PTHLH produceren of dat de functie van IHH overgenomen wordt door TGFB, dat juist in de hooggradige perifere chondrosarcomen hoger tot expressie komt. Ook is het mogelijk dat het aan IHH en TGFB gerelateerde WNT deze functie overneemt.

In **hoofdstuk 3** werden deze signaaltransductieroutes in centrale chondrosarcomen onderzocht. Het bleek echter dat, in tegenstelling tot in de perifere chondrosarcomen, in centrale chondrosarcomen EXT normaal is, zowel de DNA-volgorde als de afschrijving op mRNA-niveau. Tevens was IHH normaal actief, hoewel er toch afwijkingen in de distributie van de HSPG's in de matrix gevonden werden. Een van de HSPG's, syndecan-2, werd zelfs intracellulair in de kraakbeencellen gevonden in plaats van in de matrix. Meer onderzoek is nodig om deze bevinding te kunnen verklaren.

Door middel van β -catenine kleuring vonden we in graad I centrale chondrosarcomen een significant hogere activiteit van WNT dan in enchondromen (respectievelijk 48% en 17%) (Figuur 3.3). Deze verschillen zijn echter niet groot genoeg om β -catenine een rol te geven als immunohistologische marker bij het maken van onderscheid tussen beiden.

Markers om de prognose van chondrosarcomen te voorspellen

Veel onderzoeken hebben zich toegespitst op de vraag of er moleculaire markers zijn die de prognose van chondrosarcomen kunnen voorspellen. In **Hoofdstuk 2** werd naast variatie in het onderscheid tussen benigne en maligne kraakbeentumoren, ook een grote variatie in het graderen van hooggradige chondrosarcomen gevonden. Gradering is momenteel de enige basis voor het stellen van prognoses. De grote variatie hierin bevestigt de noodzaak van het ontdekken van objectieve moleculaire markers die het onderscheid tussen de drie verschillende graden kunnen maken en daarmee de keuze voor een bepaalde behandeling en de te verwachte prognose kunnen aanwijzen.

In dit proefschrift werd de vraag naar prognostische markers voor chondrosarcomen uitgediept. In **hoofdstuk 3** werd een associatie gevonden tussen histologische graad (volgens Evans) en de expressie (mate van aanwezigheid) van TGFB (Figuur 3.3). TGFB is verantwoordelijk voor velerlei signaaltransductie routes die bijvoorbeeld leiden tot proliferatie, overleving van cellen, de vorming van matrix (steunweefsel) rond cellen en het vormen van bloedvaten. Het is dus goed voor te stellen dat maligne tumoren beter in staat zijn deze eigenschappen te verzamelen dan benigne. Bij analyse van deze uitkomsten in het kader van de uitgebreide follow-up kon echter geen relatie tussen TGFB en een slechte prognose gelegd worden die onafhankelijk was van histologische graad.

Datzelfde gold voor *CDK4* en *MDM2* in **hoofdstuk 4**. Beide genen zijn gelegen op chromosoom 12q13, een locus waarvan uit eerdere studies bleek dat deze geamplificeerd is in centrale chondrosarcomen. Tevens hebben beide genen een functie in de celcyclus. De celcyclus is een soort voorgeprogrammeerd protocol dat de levensverwachting en voortplanting van een cel dicteert. Cellen doorlopen achtereenvolgens een M-fase (Mitose) waarin de kern wordt gedeeld en de cel wordt gesplitst. De periode tussen twee M-fases wordt de interfase genoemd. De interfase bestaat uit de G1-, S- en G2-fase (Figuur 4.3). Tijdens de S-fase (Synthese), repliceert de cel zijn DNA, wat essentieel is voor celdeling. Voorafgaand aan, én aansluitend op de S-fase zijn er twee fases waarin de cel kan groeien: de G1- en G2-fase (Gap (*ruimte*)). Gedurende deze gap-fases wordt er ook gecontroleerd of er geen fouten gemaakt zijn bij de replicatie en of alle voorbereidingen getroffen zijn om de cel te laten doorgaan met de volgende fase. Deze controle wordt onder andere uitgevoerd door *CDK4* en *MDM2*.

In centrale chondrosarcomen werd een correlatie gevonden tussen zowel amplificatie van 12q13 en een verhoogde expressie van *CDK4*, als tussen de expressie van *CDK4* en *MDM2* en histologische graad (figuur 4.3). Echter, een relatie, onafhankelijk van histologische graad, tussen *CDK4*-expressie en prognose kon niet worden vastgesteld.

Het onderzoek naar de variatie in gradering van kraakbeentumoren, beschreven in hoofdstuk 2, bevestigt tevens dat conclusies uit studies naar nieuwe moleculaire markers altijd in het kader van uitgebreide follow-up getrokken moeten worden. Onderzoeksresultaten moeten dus gerelateerd worden aan objectieve gegevens zoals “metastasevrije periode”. Tevens benadrukt het de noodzaak van een goede archivering van studiemateriaal, zowel het patiëntenmateriaal als de bijbehorende follow-up data.

Nieuwe strategieën voor de behandeling van chondrosarcomen

Chondrosarcomen reageren niet op conventionele radiotherapie en chemotherapie. Dat betekent dat chirurgie de enige curatieve behandelingsmodaliteit is. Curatief wil zeggen dat als doel van de behandeling genezing wordt beoogd, in tegenstelling tot palliatief waarbij pijnbestrijding en het behoud van kwaliteit van leven als doel gesteld wordt.

Dit impliceert dat patiënten bij wie het chondrosarcoom ontstaan is op een plaats die niet toegankelijk is voor chirurgie met vrije marges (bijvoorbeeld in de bekken- of de schedelbasisbotten), en patiënten met tumoren die gemetastaseerd zijn naar organen zoals de longen, per definitie niet curatief behandeld kunnen worden waardoor ze een zeer slechte prognose hebben. Recent echter lijken er goede resultaten te zijn voor deze tumorlokalisaties bij bestraling met protonen, waarbij de stralingsbundel heel precies gericht kan worden en er minimale schade aan de omliggende weefsels ontstaat. De laatste doelstelling van dit proefschrift was het ontwikkelen van nieuwe strategieën voor de medicamenteuze behandeling van chondrosarcomen.

Deze doelstelling werd op twee manieren aangepakt: volgens op hypothesen gebaseerde methodes (hoofdstuk 3, 4 en 6) en volgens een op screening gebaseerde methode (hoofdstuk 5). Nieuwe strategieën verkregen uit beide methodes werden *in vitro* getest op levende chondrosarcoomcellen. Tevens werd één strategie verder bestudeerd in een chondrosarcomen muizenmodel, *in vivo*.

In **hoofdstuk 3** werd onderzocht of de activiteit van IHH, die in centrale chondrosarcomen aanwezig bleek te zijn, als aangrijpingspunt voor therapie kon dienen. Zes chondrosarcoom-cellijnen werden daartoe behandeld met cyclopamine. Cyclopamine remt de activiteit van de IHH signaaltransductieroute door het blokkeren van intercellulair SMO. Het is momenteel in ontwikkeling als behandeling van onder andere glioblastomen en medulloblastomen (twee soorten hersentumoren). Echter, in slechts een van de zes chondrosarcoom-cellijnen werd de celgroei geremd. Verder onderzoek naar de effectiviteit van cyclopamine bij de behandeling van kraakbeentumoren lijkt derhalve niet zinvol.

Een ander aangrijpingspunt voor de behandeling van chondrosarcomen is beschreven in **hoofdstuk 4**, te weten de verhoogde expressie van *CDK4* in hooggradige chondrosarcomen. *In vitro* werd met behulp van short hairpin RNA (shRNA) alle *CDK4* activiteit in drie chondrosarcoom-cellijnen weggevangen. Deze shRNA-stukjes werden in de cellen gebracht met behulp van lentivirussen. Dit leidde in alledrie de cellijnen tot remming van de celgroei. Eenzelfde effect werd bewerkstelligd door het herintroduceren van het *p16*-gen in deze cellen. Het *p16*-eiwit heeft een remmende rol in de celcyclus waarin ook *CDK4* betrokken is. In hooggradige centrale chondrosarcomen is

de genetische informatie van het *p16* gen vaak verdwenen (gedeteerd). Door het herintroduceren van p16, eveneens met behulp van lentivirussen, werd de celgroei geremd in de drie chondrosarcoom cellijnen. Beide strategieën zijn echter alleen toepasbaar in het laboratorium en niet op patiënten. Van het middel Flavopiridol is bekend dat het CDK's remt *in vivo*. Flavopiridol zou dus door het remmen van CDK4 een rol kunnen spelen bij de behandeling van chondrosarcomen. Meer onderzoek is nodig om dit verder uit te diepen.

Uit de vakliteratuur en de studie beschreven in **hoofdstuk 6** blijkt dat cyclo-oxygenase-2 (COX-2) ook verhoogd tot expressie komt in hooggradige chondrosarcomen, wat een interessant aangrijpingspunt is voor therapie. Tevens werd in enchondromatosis gerelateerde tumoren een hogere COX-2-expressie gevonden dan in solitaire tumoren. COX-remmers zijn geregistreerd als analgetica en ontstekingsremmers en er is veel onderzoek gedaan naar hun veiligheid. Celecoxib en NS-398, twee selectieve COX-2-remmers, bleken *in vitro* celgroei te remmen in drie van de vier chondrosarcoom cellijnen. Vervolgens werd de behandeling met celecoxib in een chondrosarcoom muizenmodel onderzocht. Bij immunoincompetente muizen werden menselijke chondrosarcoomcellen onder de huid ingespoten. Deze cellen vormen een xenograft en zo kan de groei van de tumor tijdens het experiment, vanaf de buitenkant van de muis, gevolgd worden. De muizen werden behandeld met ofwel een celecoxib profylaxe, dat wil zeggen dat de behandeling één week voordat chondrosarcoomcellen ingespoten werden, gestart werd, ofwel de behandeling werd gestart vier weken nadat de cellen ingespoten waren. Beide groepen werden nog onderverdeeld in lage en hoge dosis celecoxib. De profylaxegroep boekte vooral in de eerste vier weken van het experiment goede resultaten en de tumoren bleven kleiner dan in de controlegroep. Na week zes begonnen de tumoren die met een lage concentratie celecoxib behandeld werden (zowel de profylaxe- als de behandelingsgroep) harder te groeien dan de controlegroep. De tumoren die profylactisch met een hoge dosis celecoxib werden behandeld, bleven gedurende het hele experiment kleiner dan die in de controlegroep. Er lijkt dus een beschermend effect te zijn van een hoge concentratie celecoxib profylaxe, wat een optie zou kunnen zijn voor de behandeling van enchondromen en osteochondromen bij EC- en MO-patiënten ter voorkoming van maligne ontaarding. Echter, meer onderzoek naar de plotselinge groeiversnelling bij lage celecoxibconcentraties is nodig voordat therapie bij patiënten gerechtvaardigd kan worden.

In **hoofdstuk 5** werd op een screenende wijze gezocht naar nieuwe strategieën voor de behandeling van chondrosarcomen. Hiertoe werd gebruik gemaakt van "kinome profiling" met behulp van de nieuwe Pepchip[®]-techniek. Het kinoom is de verzameling van kinases in het menselijk lichaam. Een kinase is een enzym dat een fosfaatgroep kan aanbrengen op een ander eiwit of

een ander molecuul (fosforylering). Door fosforylering wordt het doeleiwit geactiveerd of geïnactiveerd. Deze schakelfunctie kan zo chemische reacties in de cel aansturen en vormt een belangrijke factor in de interne signaaltransductie. Dat maakt kinases een uitermate goed aangrijpingspunt voor behandeling. De fosfaatgroep die wordt gebruikt door een kinase is vaak afkomstig van een molecuul adenosine-tri-fosfaat (ATP) en op dit principe berust de Pepchip®, waarbij activiteit van de kinases gemeten wordt door het inbouwen van radioactief fosfaat.

In het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 5** werd activiteit van kinases gemeten in vier chondrosarcoom cellijnen en negen primaire kweken van chondrosarcoompatiënten. Activiteit van de Src-familie van kinases en van PDGFRβ werd gevonden in alle celkweken. Src is een belangrijke regulator in verschillende intracellulaire processen, zoals embryogenese en celdgroei. Genetische mutaties in het Src-gen leiden tot een verhoogde graad van maligniteit van colorectaal carcinomen. In **hoofdstuk 5** werden vervolgens Src-remmer dasatinib, bekend van de behandeling van leukemieën, en PDGFRβ-remmer imatinib, bekend van de behandeling van gastro-intestinale stromaceltumoren, getest op hun celdgroeiremmende eigenschappen op chondrosarcoomcellen. Hoewel chondrosarcomen ongevoelig bleken te zijn voor imatinib, werd met dasatinib in zeven van de negen celkweken een groeiremmend effect waargenomen. Hiermee is dasatinib geïdentificeerd als een potentiële behandelingsoptie voor inoperabele chondrosarcomen en deze bemoedigende data verdienen in de toekomst verdere aandacht in *in vivo* modellen voor chondrosarcoomgroei, alsmede in klinische trials.

Naast de Src-familie werden met behulp van de Pepchip® ook nog AKT, Aurorakinase B en CDK2 geïdentificeerd als actief in chondrosarcoom celkweken. Elk van deze kinases is interessant voor verdere studies naar nieuwe behandelingsstrategieën voor het chondrosarcoom. Van AKT is in andere studies aangetoond dat het een rol speelt in de overleving van chondrosarcoomcellen. AKT speelt een rol in verschillende pathofysiologische processen zoals het ontstaan van diabetes mellitus, Alzheimer en carcinogenese. AKT-activiteit kan geremd worden met behulp van Enzastaurine. Momenteel worden *in vitro* experimenten uitgevoerd die gebaseerd zijn op deze bevinding.

Aurorakinase B speelt een belangrijke rol bij de celdeling. Het zorgt ervoor dat het DNA op de juiste manier uit elkaar getrokken wordt tijdens de mitose. Overexpressie van Aurorakinase B kan leiden tot aneuploidie: een onevenwichtige verspreiding van het genetische materiaal tussen twee kernen. Aneuploidie wordt veel gevonden in hooggradige chondrosarcomen. Pyrazoloquinazolines als AZD-1152 zijn in staat Aurorakinase B te remmen. Flavopiridol, dat in **hoofdstuk 4** als potentiële therapie voor chondrosarcomen genoemd werd als CDK4-remmer, heeft ook een remmende werking op CDK1 en 2. Het feit dat CDK1 en 2-remming en daarmee Flavopiridol in

hoofdstuk 5 opnieuw als mogelijke strategie voor behandeling gevonden wordt, versterkt het belang van deze bevindingen.

Samenvattend hebben zowel de hypothese-gerelateerde als de screenende methode meerdere voorzetten gegeven voor vervolgstudies, welke hopelijk zullen leiden tot nieuwe therapeutische strategieën voor de behandeling van inoperabele en gemetastaseerde chondrosarcomen.