



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Microscopical evaluation of prognostic factors in colorectal cancer

Mesker, W.E.

### Citation

Mesker, W. E. (2008, June 12). *Microscopical evaluation of prognostic factors in colorectal cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12950>

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/1887/12950>

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

## **Chapter 8**

Nederlandse samenvatting



Dikke darmkanker is wereldwijd de vierde meest voorkomende maligniteit na borstkanker, prostaat en longkanker. Alleen al in Nederland overleden in 2004 2.260 mannen en 2.175 vrouwen ten gevolge van deze ziekte. De incidentie van dikke darmkanker in Nederland is hoog vergeleken bij andere landen. Het aantal nieuwe patiënten per jaar is 9.898 en dit aantal zal blijven toenemen door vergrijzing van de huidige populatie. Ten aanzien van de periode van 2005-2025 wordt verwacht dat het aantal nieuwe patiënten stijgt met 41.7%.

Om deze reden is er begonnen met een bevolkingsonderzoek waarbij mensen boven een bepaalde leeftijd, zonder symptomen, worden onderzocht. De Fecale Occulte Bloed Test (FOBT) toont spoortjes bloed aan in de ontlasting wat kan duiden op de aanwezigheid van een darmtumor. Indien de test elke 2 jaar wordt uitgevoerd vermindert vroegtijdig onderzoek met behulp van de FOBT het risico op overlijden ten gevolge van darmkanker met 15-20%.

Voor patiënten met een tumor is de aanwezigheid van lymfeklier metastasen in veel gevallen van kanker een zeer belangrijke prognostische parameter, die bepalend kan zijn voor de therapie, zo ook voor darmkanker. De "American Joint Committee on Cancer (AJCC)" werkt sinds 1959 aan een uniform classificatiesysteem voor de staging van kanker. Dit internationaal geaccepteerde systeem voorziet in een nauwkeurige beschrijving van de verschillende typen tumoren met als doel een universeel systeem te bieden dat kan worden gebruikt voor de beschrijvende ziekteleer, om patiënten groepen te vergelijken en therapie te bepalen, patiënten te selecteren voor klinische trials, resultaten van klinische trials te analyseren en de prognose met de patiënt te bespreken.

De algemeen geaccepteerde prognostische factoren voor dikke darmkanker zijn lokalisatie van de tumor, grootte (T), de aanwezigheid van lymfeklier metastasen (N) en metastasen op afstand (M), allen deel uitmakend van het klassieke TNM classificatiesysteem.

Patiënten met negatieve lymfeklieren (TNM stadium I en II) krijgen doorgaans geen aanvullende chemotherapie of radiotherapie. Echter, vijftientig procent van alle stadium II patiënten vertoont terugkeer van de ziekte. Het geven van chemotherapie (fluorouracil en foliumzuur) aan alle stadium II patiënten geeft echter maar een behandelingswinst van 3.6%, zoals onlangs is gerapporteerd in een publicatie van de "QUASAR Collaborative Group" en is onder de grens van 5% die als minimum wordt geaccepteerd. Dit heeft er toe geleid dat chemotherapie niet als standaardtherapie aan stadium II patiënten wordt gegeven, maar alleen aan patiënten met een verhoogd risico op terugkeer van de ziekte (recidief), zoals aan patiënten met een T4 tumorstadium, doorgroei van de tumor in de bloedvaten, een laag aantal verwijderde lymfeklieren ( $N < 12$ ) en perforatie of obstructie. Aannemende dat de 5-jaars mortaliteit zonder chemotherapie 20% is, zou behandeling van deze groep resulteren in een absolute winst van 5.4% voor hoogrisico patiënten in vergelijking tot 3.6% voor de totale stadium II groep.

Hoewel er verschillende opties zijn voor het geven van aanvullende therapie is de klinische vraag die voor ligt evident: hoe kan een behandeling gekozen worden die het best past bij de individuele patiënt?

Op dit moment staat de prognostische waarde van de huidige TNM classificatie ter discussie. Door de hedendaagse vroege detectie van tumoren is de grootte van de

tumor minder belangrijk geworden. De vraag is dan ook of het niet méér relevant is om parameters die de biologie van de tumor reflecteren te gebruiken als minder subjectieve, onafhankelijke parameter voor prognose. De tumorbiologie kan tevens worden gebruikt als voorspellende parameter ten aanzien van de respons op de behandeling.

In dit proefschrift zijn microscopische, op celniveau gebaseerde, prognostische parameters beschreven om patiënten te selecteren voor aanvullende therapie.

Automatische microscopie is toegepast om de analyse van lymfeklieren op het voorkomen van tumorcellen, de belangrijkste parameter van de TNM classificatie, te verbeteren. De tumor-stroma verhouding van de primaire tumor is als nieuwe parameter geïntroduceerd. Er is ook onderzoek gedaan naar genomische veranderingen in primair tumorweefsel die correleren met de aanwezigheid van gedissemineerde tumorcellen in het beenmerg.

Een globaal overzicht over dikke darmkanker wordt gegeven in **hoofdstuk 1**. In dit hoofdstuk zijn parameters besproken die momenteel worden gebruikt in de routine pathologie voor het selecteren van patiënten met een verhoogd risico op terugkeer van de ziekte. Verder zijn nieuwe biologische en moleculaire prognostische markers besproken en hun relatie tot het huidige TNM classificatiesysteem.

Biologische parameters zoals de aanwezigheid van micrometastasen (kleine groepjes tumorcellen  $>0.2$  mm en  $<2$  mm) in lymfeklieren, gedissemineerde tumorcellen in beenmerg (DTC's) en circulerende tumorcellen (CTC's) in perifere bloed zijn van

prognostisch belang en geven inzicht in het proces van disseminatie en metastasering zoals beschreven in hoofdstuk 6 van dit proefschrift. Echter, het vinden van deze vaak zeldzaam voorkomende cellen wordt bemoeilijkt door hun lage frequentie. Standaard microscopische beoordeling van meerdere lymfekliercoupes of preparaten, gemaakt van beenmerg of perifere bloed, is een tijdrovende en moeilijk te reproduceren taak. Automatische microscopie kan deze taak in belangrijke mate ondersteunen. In **hoofdstuk 2** worden de mogelijkheden voor automatische analyse van lymfeklieren, beenmerg en bloed met behulp van automatische systemen besproken. Hierbij wordt software gebruikt om de cellen te identificeren op basis van hun immunohistochemische of immunocytochemische kleurresultaat. Een patholoog beoordeelt de geselecteerde objecten en bepaalt de uiteindelijke uitslag. In dit hoofdstuk worden de mogelijkheden besproken van de huidige commercieel verkrijgbare apparatuur en de toepasbaarheid van deze apparatuur voor routinediagnostiek.

In **hoofdstuk 3** wordt automatische microscopie toegepast voor het vinden van micrometastasen in de lymfeklieren van stadium II patiënten om patiënten te identificeren met een hoog risico op terugkeer van ziekte. Een soortgelijke studie is eerder uitgevoerd door Liefers et al met behulp van RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) voor CEA (carcino-embryonaal antigeen) in histologisch negatieve lymfeklieren. De 5-jaar overleving voor de groep patiënten met micrometastasen in de lymfeklieren was 50% ten opzichte van 91% voor de groep zonder micrometastasen ( $p=0.02$ ).

Dezelfde patiëntengroep werd nogmaals onderzocht, waarbij een flatbed-scanner is gebruikt om paraffinecoupes van het lymfeklierweefsel te analyseren. Paraffineblokken werden serieel gesneden en immuunhistochemisch gekleurd met behulp van antilichamen tegen het cytokeratine van de cellen. Van elke lymfeklier zijn 10 glaasjes gemaakt met elk 5 coupes van 10 verschillende snij-niveaus. De resultaten uit deze studie laten zien dat, door het aansnijden van meerdere niveaus van de lymfeklier, en immuunhistochemische kleuring voor cytokeratine, toch micrometastasen worden gevonden bij alle (100%) klier-negatieve patiënten met een recidief. Bij patiënten zonder recidief werden in 43% micrometastasen in de lymfeklieren gevonden. Deze resultaten zijn vergelijkbaar met die van Liefers et al. wat voor deze patiënten een verandering in TNM classificatie van stadium II naar stadium III en dus aanvullende therapie kan betekenen.

Met behulp van flatbed-scanning is het mogelijk meer microscopische preparaten te analyseren dan in de routinepathologie waardoor een grotere gevoeligheid wordt bereikt. De automatische analyse van lymfekliercoupes is inmiddels geïmplementeerd in het software programma van het ARIOL systeem (Applied Imaging, Genetix). Dit resulteerde in een vergelijkbare gevoeligheid, maar in een meer gebruikersvriendelijke methode die geschikt is voor routinematige toepassingen.

In een volgende studie werd onderzocht hoeveel snij-niveaus noodzakelijk zijn om alle patiënten met een recidief op te sporen. Uit deze studie is gebleken dat de analyse van 4 snij-niveaus met een tussenstap van 200  $\mu$ m voldoende is als compromis tussen gevoeligheid en praktische

toepasbaarheid. Men zou kunnen overwegen om deze techniek te implementeren in de routine pathologie. Echter, gezien het aantal chirurgisch verwijderde lymfeklieren in dikke darmkanker per patiënt vaak 20 is of meer, lijkt het aangewezen deze aanpak te reserveren voor de analyse van poortwachterklieren.

De aanwezigheid van tumorcellen in het beenmerg (BM) van patiënten met kanker wordt geassocieerd met een slechte prognose; dit geldt met name voor patiënten met borstkanker. Om deze parameter ook te evalueren voor dikke darmkanker is het LUMC vanaf het jaar 2000 begonnen met het verzamelen van beenmerg van patiënten met CRC. Een gestandaardiseerde methode werd ontwikkeld die bestond uit de aspiratie van 5 ml BM van beide crista's, de preparatie van glaasjes met 2 miljoen cellen en antilichaamkleuring voor het cytokeratine van de cellen, gevolgd door automatische microscopische analyse van de verkregen glaasjes. Tot op heden zijn ongeveer 300 patiënten geanalyseerd waarin in 15% van deze patiënten tumorcellen in het beenmerg zijn gevonden.

**Hoofdstuk 4** beschrijft het gebruik van array-CGH om genomische afwijkingen te vinden in primaire tumoren van BM-positieve patiënten in vergelijking met BM-negatieve patiënten die, op basis van tumor locatie en TNM classificatie, overeen kwamen. Het doel van deze studie was een specifiek genomisch profiel te identificeren dat correleert met het ontstaan van micrometastasen in beenmerg. Vergeleken met de BM-negatieve groep werd een hoger aantal genomische veranderingen gevonden in de BM-positieve groep welke tevens bevestigd zijn met

FISH (fluorescentie in situ hybridisatie). Specifieke chromosoomgebieden als 6p (p21.1), 9p (p11.2-p13.3), 12q (q13) en 16 en 19 (hele chromosoom) waren vaker in verhoogd kopie-aantal aanwezig in de BM-positieve groep, evenals het verlies van chromosoom 11q (q22.3-q25) en 15q (q11.2-q12 en q14-q21). In dit hoofdstuk is een interessante set markers geïdentificeerd die weliswaar niet uitsluitend maar voornamelijk werd gevonden in patiënten met gedissemineerde tumorcellen in het beenmerg. Verder onderzoek is noodzakelijk om de waarde van deze markers vast te stellen.

Indien array-CGH wordt toegepast voor onderzoek van tumorweefsel, is het gebruikelijk om die delen van de tumor te selecteren waarin de tumor het grootste aandeel vormt. Vermenging met stroma of ontstekingsweefsel kan de amplificaties (toename) en deleties (afname) van bepaalde stukjes DNA maskeren. Tijdens een nieuw op te zetten onderzoek was het opvallend dat voor een bepaalde set patiënten, met een slechte prognose, de hoeveelheid tumormateriaal minder was dan 50% en dat de primaire tumor voornamelijk uit stroma bestond. Omdat deze samples niet voldeden aan de criteria voor een betrouwbare array-CGH, werden ze beschouwd als niet geschikt voor analyse. Tumoren met een goede prognose vertoonden echter het tegenovergestelde; veel tumor en weinig stroma. Deze observatie heeft geleid tot de evaluatie van deze parameter in een grotere patiëntenserie waarvan de resultaten zijn gepresenteerd in **hoofdstuk 5**. In een retrospectieve studie van 122 patiënten (stadium I-III) met tenminste 10 jaar follow-up, werden 33 patiënten (27%) als stroma-hoog en 89 (73%) als stroma-laag

geclassificeerd. De vijf-jaar overleving van deze patiënten was respectievelijk 15.2% en 73.0% en de ziektevrije overleving 12.1% en 67.4%, waarbij stroma-hoog patiënten het slechter deden (OS  $p < 0.0001$ , HZ 3.73; DFS  $p < 0.0001$ , HZ 4.18). In een multivariaat Cox regressie-analyse bleek de hoeveelheid stroma een onafhankelijke parameter te zijn in relatie tot het stadium, of tot de tumorstatus en lymfeklierstatus (OS  $p < 0.001$ , DFS  $p < 0.001$ )

De “Transforming Growth Factor- $\beta$ ” (TGF- $\beta$ ) pathway is betrokken bij de stromaproductie. Terwijl in het normale darmweefsel TGF- $\beta$  de functie heeft van suppressor van celproliferatie en apoptose kan induceren, kan een afwijkende functie van deze pathway bijdragen tot de initiatie en progressie van kanker. SMAD eiwitten zijn signaaltransductiemoleculen van de TGF- $\beta$  pathway en essentieel voor de groei-suppressiefunctie van TGF- $\beta$ . Ze zijn werkzaam als tumorsuppressor-moleculen waarvan de mutatie, deletie en silencing zijn geassocieerd met verschillende typen kanker. SMAD4, waarvan het gen zich bevindt op chromosoom 18q21.1, is afgeschakeld in 30% van de invasieve en gemetastaseerde dikke darmtumoren.

Om de morfologische stroma-tumor verhouding moleculair te onderbouwen is in **hoofdstuk 6** immuunhistochemie toegepast voor markers die betrokken zijn bij de stromaproductie en de epitheliale-mesenchymale transitie (EMT), namelijk  $\beta$ -catenine, TGF- $\beta$ -R2 en SMAD4. Een vergelijkbare studie als gepresenteerd in hoofdstuk 5 werd uitgevoerd, maar nu gericht op stadium I en II patiënten. In deze studie is gevonden dat SMAD4 de prognostische waarde van de stroma parameter verder kan versterken. In deze studie

zijn 135 patiënten geanalyseerd waarvan 34 (25.2%) stroma-hoog en 101 (74.8%) stroma-laag. Er was een significant verschil in overlevingstijd tussen beide groepen, waarbij stroma-hoog patiënten een slechte overleving hadden (OS  $p < 0.001$ , HZ 2.73; DFS  $p = 0.001$ , HZ 2.43). Een hoog-risico groep patiënten met een hoog stroma percentage en afschakeling van SMAD4 (OS  $p = 0.008$ , DFS  $p = 0.005$ ) kon worden geïdentificeerd waarvan 12 van in totaal 14 patiënten (85.7%) overleden bleken te zijn binnen 3 jaar. De regressie-analyse laat een duidelijke relatie zien tussen stroma en SMAD4 (HZ 5.42, CI 2.13-13.82).

In hoofdstuk 5 en 6 is aangetoond dat routine H&E histologische coupes een krachtige nieuwe parameter leveren. De bepaling van de tumor-stroma ratio in combinatie met immuuncytochemische kleuring voor SMAD4 resulteert in een onafhankelijke parameter voor een meer betrouwbare voorspelling van het ziektebeloop in dikke darmkanker.

In dit proefschrift zijn prognostische parameters gepresenteerd om patiënten met dikke darmkanker te selecteren, die baat kunnen hebben bij aanvullende behandeling. Deze studies zijn gebaseerd op microscopische, op celniveau gebaseerde parameters. Echter, men moet ook vaststellen dat met technieken als expressie-profiling en proteomics veel voortgang is geboekt met betrekking tot het vinden van nieuwe prognose gerelateerde parameters. Zo is er een set genen gevonden op grond waarvan patiënten geselecteerd kunnen worden met een slecht ziektebeloop. Deze moleculaire ontwikkelingen zullen waarschijnlijk uiteindelijk resulteren in betrouwbare parameters die correleren met prognose en therapie. Maar het is opval-

lend dat een eenvoudige histologische parameter (tumor-stroma ratio), waarvoor slechts conventionele microscopie vereist is, zo'n krachtige voorspellende waarde heeft.

Verdere validatie van de tumor-stroma ratio in een multicenter studie is echter noodzakelijk. Dit zou in korte tijd moeten leiden tot een gerandomiseerde trial van stadium II patiënten met dikke darmkanker.

