



Universiteit  
Leiden

The Netherlands

## **Matrix metalloproteinases in gastric inflammation and cancer : clinical relevance and prognostic impact**

Kubben, F.J.G.M.

### **Citation**

Kubben, F. J. G. M. (2007, September 27). *Matrix metalloproteinases in gastric inflammation and cancer : clinical relevance and prognostic impact*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12356>

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/1887/12356>

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

## CHAPTER 9

# Samenvattende discussie



## Inleiding

*Helicobacter pylori* infectie van het maagslijmvlies veroorzaakt een chronische gastritis die de kans op benigne peptische ulcera en maagkanker vergroot. Ondanks de sterk gedaalde incidentie is maagkanker nog altijd de op één na meest voorkomende vorm van kanker wereldwijd, verantwoordelijk voor 10% van alle gevallen van kanker en 12% van de totale kankersterfte. Gemiddeld genomen is de vijfjaarsoverleving slechts 12% omdat de helft van de patiënten ten tijde van het stellen van de diagnose al metastasen heeft en er bij de andere helft slechts in 50% van de gevallen een in opzet curatieve resectie mogelijk is. Bij chronische ontstekingsprocessen en tumorgroei is er sprake van een ongecoördineerde afbraak en herstel van de extracellulaire matrix door proteasen, waaronder de matrix metalloproteïnasen (MMPs). In dit proefschrift staan enkele studies beschreven naar de klinische betekenis van de gelatinasen MMP-2 en MMP-9 bij chronische, door *H. pylori* veroorzaakte, gastritis alsmede het effect van eradicatortherapie hierop. Vervolgens worden onderzoeken besproken naar de klinische betekenis van MMPs, en hun natuurlijke inhibitoren TIMPs, bij maagkanker, alsmede de invloed van functionele genpolymorfismen van deze MMPs en TIMPs. Tenslotte worden de mogelijkheden en onmogelijkheden van remming van MMPs bij gastritis en maagkanker besproken.

## Matrix metalloproteïnasen bij chronische gastritis en maagkanker

In een overzicht (**hoofdstuk 1**) staan de belangrijkste kenmerken en functies van MMPs, TIMPs en lipocalinen beschreven. In het kort samengevat, MMPs zijn proteolytische enzymen met een centraal zinkion, die in inactieve vorm uitgescheiden worden en geactiveerd dienen te worden door beperkte proteolyse voordat ze hun biologische functie kunnen uitoefenen. Ze worden geïnactiveerd door zogenaamde TIMPs: tissue inhibitors of metalloproteinases. TIMPs zijn natuurlijk voorkomende MMP remmers die complexen vormen met de meeste MMPs. Gebaseerd op overeenkomsten in eiwitstructuur en substraatvoorkeur worden de MMPs verdeeld in subgroepen, te weten collagenasen, stromelysinen, matrilysinen, gelatinasen, elastasen en membraan-type MMPs. De studies in dit proefschrift zijn gericht op MMP-2, MMP-7, MMP-8 en MMP-9 vanwege de veronderstelde klinische betekenis van deze MMPs bij gastritis en maagkanker. MMP-2 en MMP-9 zijn gelatinasen die specifiek basaalmembraan collageen type IV en gelatines afbreken. MMP-2 wordt vooral door stromacellen geproduceerd, terwijl MMP-9 met name uit ontstekingscellen zoals neutrofiële granulocyten vrijkomt. Neutrofiel collagenase (MMP-8) wordt gesynthetiseerd in neutrophiele granulocyten voor het verlaten van het beenmerg. Matrilysine (MMP-7) wordt vooral

afgescheiden door epitheliale- en tumorcellen. De lipocalinen bestaan uit een groep kleine eiwitten met uiteenlopende biologische functies waaronder regulatie van de celhomeostase en transport van eiwitten. Eén van deze lipocalinen is neutrofiel gelatinase-geassocieerd lipocaline (NGAL, lipocaline-2), dat wordt opgeslagen in secundaire granulae van neutrofiële granulocyten en dat heterodimeren kan vormen met neutrophil gelatinase-B (MMP-9).

### **De gelatinasen MMP-2 en MMP-9 bij door *Helicobacter pylori* geïnduceerde gastritis**

Een studie naar de klinische betekenis van de gelatinasen MMP-2 en MMP-9 bij chronische, door *H. pylori* veroorzaakte, gastritis staat beschreven in **hoofdstuk 2**. Bij 45 patiënten met en 27 patiënten zonder *H. pylori* gastritis werden de MMP-2 en MMP-9 niveaus in maagbiopten gemeten. Bij patiënten met *H. pylori* gastritis werden zowel in antrum- als in corpusbiopten significant verhoogde MMP-9 niveaus gevonden ten opzichte van *H. pylori* negatieve controles. Deze verhoogde MMP-9 niveaus vertoonden een goede correlatie met de ernst van de ontsteking. Bij patiënten met een pangastritis werden in het corpus hogere MMP-9 niveaus gevonden dan bij patiënten met een antrale gastritis. Immunohistochemisch was MMP-9 voornamelijk gelocaliseerd in ontstekings- en stromacellen en in pariëtale cellen in het corpus. MMP-2 niveaus in maagbiopten van *H. pylori* positieve en negatieve patiënten verschilden nauwelijks van elkaar. Aangezien *H. pylori* gastritis geassocieerd is met het maagcarcinoom, en zowel bij *H. pylori* gastritis en het maagcarcinoom veranderde MMP-profielen worden gevonden, hebben wij een studie uitgevoerd naar het effect van *H. pylori* eradicatortherapie op deze MMP-profielen, zoals in **hoofdstuk 3** staat vermeld. Daartoe werden 58 patiënten met *H. pylori* gastritis behandeld met *H. pylori* eradicatortherapie, bestaande uit een combinatie van zuurremmende medicatie en antibiotica, gedurende 14 dagen. Na succesvolle eradicatortherapie was er sprake van een significante daling van MMP-9 niveaus in antrum- en corpusbiopten, terwijl na persisterende *H. pylori* infestatie deze nauwelijks veranderden. MMP-2 niveaus veranderden niet na succesvolle eradicatie.

De MMP-9 niveaus in het antrum bij patiënten met *H. pylori* gastritis liggen een factor drie hoger dan in het corpus. Aangezien MMP-9 voornamelijk gesecerneerd wordt door ontstekingscellen is dit verklaarbaar door de intensere ontstekingsreactie in het antrum vergeleken met die in het corpus. Dit hangt mogelijk samen met de langzame uitbreiding van antrum naar corpus van de gastritis als gevolg van een minder intense *H. pylori* infestatie van het corpus door locale zuurproductie. Gastritis door *H. pylori* gaat gepaard met verhoging van mucosale cytokines die migratie en activatie van

ontstekingscellen veroorzaken en die tevens het vrijkomen van MMP-9, en in mindere mate van MMP-2, stimuleren. Activatie van het gen dat codeert voor MMP-2 door cytokines wordt namelijk verhinderd door de afwezigheid van een zogenaamde AP-1 bindingsplaats. Samenvattend neemt de actieve en chronische ontstekingscomponent in maagslijmvlies af na succesvolle *H. pylori* eradicaatie, hetgeen gepaard gaat met een significante afname van MMP-9 niveaus, met name in het antrum.

## De gelatinasen MMP-2 en MMP-9 bij maagkanker

De resultaten van een pionierstudie naar de klinische betekenis van de gelatinasen MMP-2 en MMP-9 bij het maagcarcinoom worden besproken in **hoofdstuk 4**. MMP-2 en MMP-9 niveaus werden gemeten in 50 maagcarcinomen en corresponderende normale maagmucosa door middel van gelatine-zymographie. Bij de meeste maagcarcinomen werd een verhoogd MMP-2 en MMP-9 niveau gemeten, zonder duidelijke relatie met type histologie of TNM-stadium. Als één van de eersten vonden we een verband tussen verhoogde MMP-2 en MMP-9 niveaus en slechtere overleving, onafhankelijk van de belangrijkste klinische- en pathologische variabelen.

## MMPs en TIMPs bij maagkanker

De resultaten van een uitgebreidere vervolgstudie naar verschillende MMPs en TIMPs bij een grotere groep patiënten met een maagcarcinoom, onder gebruikmaking van modernere analysetechnieken, staan in **hoofdstuk 5** van dit proefschrift. Bij 81 patiënten werden naast MMP-2 en MMP-9 ook het MMP-7, MMP-8, TIMP-1 en TIMP-2 niveau gemeten. De niveaus van alle gemeten MMPs en van TIMP-1 waren in tumorweefsel significant verhoogd in vergelijking met normaal maagslijmvlies. Ongeacht de bepalingmethode vonden we nog steeds een significant verband tussen hogere MMP-2 waarden in tumorweefsel en slechtere overleving, onafhankelijk van differentiatiegraad van de tumor en tumorstadium. Geen verband met de overleving werd gevonden voor de andere MMPs en voor de TIMPs, ook niet (meer) voor MMP-9.

De consistente prognostische betekenis van MMP-2 wordt onderstreept door het feit dat zowel de initieel onderzochte groep van 50 patiënten als de later toegevoegde groep van 31 patiënten onafhankelijk van elkaar onderverdeeld konden worden op basis van dezelfde discriminerende waarde van MMP-2 met betrekking tot de prognose. Inmiddels hebben verschillende immunohistochemische, zymographische en mRNA studies de klinische relevantie van MMP-2 als onafhankelijke prognostische factor bij het maagcarcinoom bevestigd. De relatie tussen een verhoogd MMP-9

niveau en overleving kon in deze uitgebreidere studie, met een grotere groep patiënten, niet bevestigd worden.

## NGAL bij maagkanker

Naast de gelatinasen MMP-2 en MMP-9 bevatten de onderzochte zymogrammen van maagcarcinomen, extra banden veroorzaakt door heterodimeren van neutrofiel-gelatinase met lipocaline (NGAL of lipocaline-2). In **hoofdstuk 6** wordt een aanvullende analyse naar de presentatie van deze MMP-9/NGAL complexen in maagcarcinomen en de mogelijke klinische betekenis hiervan besproken. NGAL en MMP-9/NGAL complexen werden door middel van ELISAs en bioactiviteit-assays bepaald in weefselhomogenaten van dezelfde 81 patiënten als besproken in de studie van hoofdstuk 5. In maagcarcinomen werden significant verhoogde MMP-9, NGAL en MMP-9/NGAL niveaus gevonden vergeleken met normale maagmucosa. Hoge MMP-9/NGAL spiegels waren geassocieerd met slechtere overleving, terwijl NGAL en MMP-9 waarden niet geassocieerd waren met overleving. Deze bevindingen wijzen erop, dat niet zozeer de verhoogde presentatie van beide enzymen geassocieerd is met prognose, maar meer de mate van activiteit van MMP-9. MMP-9 en NGAL waren immunohistochemisch vooral gelocaliseerd in neutrofiële granulocyten en maagcarcinoomcellen. Immunofluorescentie dubbelkleuringen wezen echter uit dat, hoewel MMP-9 en NGAL in elkaars nabijheid voorkwamen, er slechts een beperkte co-localisatie van beide kleuringen was als maat voor complexvorming tussen beide factoren. De bevinding dat MMP-9/NGAL complexen geassocieerd zijn met overleving is in overeenstemming met de veronderstelde remming van de autolyse van MMP-9 door NGAL waardoor er een grotere hoeveelheid MMP-9 circuleert. MMP-9 stimuleert tumorangiogenese en tumorgroei.

## MMP en TIMP genpolymorfismen bij maagkanker

Als laatste is er een studie gedaan naar het verband tussen genpolymorfismen in de MMP -2, -7, -8, -9 en TIMP -1, -2 genen en klinische- en histologische variabelen, zoals tumorstadium en overleving, bij patiënten met een maagcarcinoom. Genpolymorfismen zijn veranderingen in een stukje DNA, waarbij een enkel nucleotide in het genoom vervangen is door een ander. Er zijn aanwijzingen dat genpolymorfismen in MMP en TIMP genen de eiwitexpressie van MMPs en TIMPs kunnen beïnvloeden en vanuit Aziatische landen is beschreven dat zij de kans op het ontwikkelen van een maligniteit kunnen vergroten. Zoals in **hoofdstuk 7** staat beschreven, vonden wij een

verschil in distributie van een genpolymorfisme in het MMP-7 gen (MMP-7<sub>-181A>G</sub>) dat bovendien geassocieerd was met *H. pylori* status en overleving. Een genpolymorfisme in het TIMP-2 gen (TIMP-2<sub>-303C>T</sub>) was naast overleving ook gecorreleerd met de differentiatiegraad van de maagcarcinomen. De aanwezigheid van beide genpolymorfismen was -onafhankelijk van klinische en histologische variabelen- geassocieerd met een slechtere overleving en alle patiënten met beide genpolymorfismen bleken binnen korte tijd te zijn overleden. Er bestond geen verband tussen genpolymorfismen van MMP-2, MMP-8, MMP-9 en TIMP-1 genen en overleving. Alleen het genpromoter MMP-2<sub>-1306C>T</sub> polymorfisme was significant gecorreleerd met het MMP-2 eiwitniveau in de tumor.

## Therapeutische remming van MMPs

Omdat overexpressie van MMPs bij gastrointestinale ontstekingsprocessen en maligniteiten de angiogenese en carcinogenese bevordert, lijkt correctie van deze afwijkende MMP expressie een aantrekkelijke behandelingsoptie. De meest eenvoudige oplossing bestaat uit het daar waar mogelijk elimineren van onderliggende oorzaken, zoals bijvoorbeeld *H. pylori* eradication bij *H. pylori* gastritis en correctie van veranderde darmflora door behandeling met metronidazol bij pouchitis. Na succesvolle *H. pylori* eradication trad er inderdaad een afname van de chronische ontstekingsreactie in het weefsel op, met een parallele daling van verhoogde MMP-9 niveaus. Een dergelijke normalisatie werd ook waargenomen bij afwijkende expressie van mucosale parameters die geassocieerd worden met maagkanker en prognose, zoals groeifactoren, cytokines, plasminogeenactivatoren en superoxide dismutasen. Aangezien slechts een minderheid van de patiënten met een door *H. pylori* veroorzaakte gastritis een maagcarcinoom ontwikkelt en genetische diversiteit de gevoeligheid voor het ontwikkelen van maagcarcinoom beïnvloedt, blijft de vraag in hoeverre *H. pylori* eradication leidt tot een daling van de incidentie van het maagcarcinoom.

Veel onderzoek is verricht naar de ontwikkeling van MMP remmers. De MMP inhibitoren kunnen worden verdeeld in: 1. tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs); 2. tetracyclinederivaten; 3. peptide-achtige MMP inhibitoren en 4. non-peptide-achtige MMP inhibitoren. Synthetische TIMPs zijn als gevolg van hun lage molecuulgewicht niet geschikt voor orale toediening. Tetracyclines remmen MMPs en met name minocycline blijkt effectief bij reumatoïde artritis. De werkzaamheid van diverse MMP inhibitoren bij chronische ontstekingsziekten, zoals longemfyseem, multiple sclerose, bacteriële meningitis, afstotingsreacties en colitis en bij kanker is gebleken uit dierexperimentele studies. Helaas bleken MMP inhibitoren in klinische studies niet werkzaam. De enige geregistreerde MMP inhibitor voor gebruik bij chronische ontste-



king is periostat voor gebruik bij periodontitis. De enige MMP inhibitor die in klinische studies bij maligniteiten enig effect resorteerde, was marimastat. Bij patiënten met een inoperabel maagcarcinoom was er in de marimastat behandelde groep sprake van een niet-significante verbetering van de overleving. In een subgroep van eerder met chemotherapie behandelde patiënten was er wel sprake van een significante verbetering van de overleving (tweejaars overleving in de placebogroep 5% versus 18% in de behandelde groep). Het gebruik van marimastat werd echter beperkt door het optreden van spier- en gewrichtsklachten bij gebruik in hogere doseringen.

## Toekomstige ontwikkelingen

De in dit proefschrift beschreven studies laten de klinische betekenis zien van verschillende MMPs, TIMPs en NGAL bij *H. pylori* gastritis en het maagcarcinoom. MMP-2, MMP-7, MMP-8, MMP-9, NGAL, MMP-9/NGAL complexen en TIMP-1 bleken significant verhoogd te zijn in tumorweefsel van patiënten met een maagcarcinoom in vergelijking met normale maagmucosa. Alleen verhoogde MMP-2 en MMP-9/NGAL niveaus bleken onafhankelijk van klinische en histologische variabelen geassocieerd met slechtere overleving. Ook uit andere studies blijkt de relatie van MMP-2 met prognose. Verhoogde expressie van individuele MMPs gaat vaak gepaard met een corresponderende verhoging van hun remmende TIMPs, zoals ondermeer beschreven is voor MMP-9 en TIMP-1 bij longkankerpatiënten. Het blijft de vraag of verhoogde MMP en TIMP expressie bij het maagcarcinoom resulteert in verhoogde activiteit van deze enzymen of anderszins slechts een uiting is van een verstoorde en gedereguleerde expressie. Uit preklinisch onderzoek is gebleken dat gelatinase-B (MMP-9) een belangrijke rol speelt bij tumorgeïnduceerde angiogenese en dat in de tumor gelocaliseerde ontstekings- en stromacellen de belangrijkste bron van MMP-9 zijn. Het onder invloed van MMP-9 vrijkomen van vasculaire endotheliale groeifactor (VEGF) wordt gezien als een van de belangrijkste processen bij door MMP-9 gestimuleerde angiogenese. Net als een aantal andere MMPs kan MMP-9 echter ook angiogenese remmen door proteolytische afsplitsing van endogene inhibitoren, waaronder tumstatine uit type IV collageen, endostatine uit type XVIII collageen en angiostatine uit plasminogeen. Het matrilysine MMP-7 heeft zowel pro- als anti-angiogene eigenschappen en kan de functie van eiwitten die betrokken zijn bij proliferatie, apoptose en invadering, zoals epidermale groeifactor (EGF) en tumor necrosis factor- $\alpha$ , beïnvloeden.

Het ontbreken van een correlatie tussen neutrofiel collagenase (MMP-8) en overleving kan verband houden met de anti-metastatische eigenschappen van MMP-8, omdat bijvoorbeeld de expressie van MMP-8 in een agressieve borstkankercellijn sterk verlaagd was in vergelijking met een minder agressieve cellijn.

Het gebrek aan effectiviteit in klinische studies van MMP inhibitoren lijkt samen te hangen met een meer complexe rol van de verschillende MMPs in de verschillende stadia van de carcinogenese dan aanvankelijk werd aangenomen en toont de noodzaak om MMPs te selecteren die in aanmerking komen voor selectieve remming. MMP-2 lijkt een geschikt doelwit voor remming vanwege de verhoogde expressie in tumoren, de correlatie met invasief gedrag van deze tumoren en het vermogen om gelatinase af te breken. In experimentele modellen blijkt MMP-2 inderdaad geassocieerd te zijn met angiogenese, tumorgroei en metastasering. De verhoogde MMP-2 niveaus in maagcarcinomen, de correlatie van het MMP-2<sub>-1306C>T</sub> genpolymorfisme met MMP-2 niveaus in de tumor en de onafhankelijke correlatie van MMP-2 niveaus in de tumor met prognose en overleving ondersteunen verder de gedachte dat remming van MMP-2 een geschikte interventie lijkt bij het maagcarcinoom.

Vanwege het verhoogde MMP-7 niveau in maagcarcinomen, de relatie met tumorstadium en de relatie van het MMP-7<sub>-181A>G</sub> genpolymorfisme met prognose, en op basis van gegevens uit dierexperimenteel onderzoek, lijkt ook MMP-7 een geschikt doelwit voor remming. MMP-3 en MMP-8 spelen een belangrijke rol in homeostase en dienen wellicht niet geremd te worden. MMP-9 stimuleert vroeg in het proces van maligne onttaarding de tumorgroei door toename van de angiogenese maar heeft later in het ziekteproces tumorremmende eigenschappen door vorming van angiostatine, tumstatine en endostatine. MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 en MMP-14 zijn betrokken bij de splitsing en inactivatie van CXCL12, een chemokine dat metastaserende kankercellen aantrekt. Remming van deze MMPs zou zelfs metastasering kunnen bevorderen. Om de onderscheiden functies van MMPs te kunnen begrijpen, teneinde MMPs te kunnen selecteren die in aanmerking komen voor selectieve remming, is het belangrijk het volledige substraat van MMPs bij maligniteiten *in vivo* in kaart te brengen. Een voorbeeld van een veelbelovende selectieve MMP inhibitor is Rp-28-2653, die selectief MMP-2, MMP-9 en membraan-type 1 (MT1)-MMP remt en levermetastasen remt in een diermodel voor het pancreascarcinoom. De ontwikkeling van MMP inhibitoren blijft echter een uitdaging vanwege de overlap in actieve plaatsen van MMPs. De weinig succesvolle klinische studies die tot dusverre met MMP inhibitoren uitgevoerd zijn vonden alle plaats bij patiënten met voortgeschreden of uitbehandelde maligniteiten. Omdat MMP inhibitoren ingrijpen in de tumorangiogenese, verdient het overweging MMP inhibitoren vooral in te zetten in een vroeg stadium van de ziekte, bij premaligne aandoeningen (bijvoorbeeld bij Familiaire Adenomatosi Coli patiënten met dunne-darmadenomen), en als secundaire preventie van kanker bij risicogroepen. Aangezien uit experimenteel onderzoek gebleken is dat MMP inhibitoren de groei van metastaserende cellen en de metastase gerelateerde botbouw remden, is een andere mogelijke toepassing het gebruik bij patiënten met botmetastasen ter vertraging van de botafbraak. Andere technieken die onder-

zocht worden zijn RNA silencing technologie ter downregulatie van endogene MMP expressie en liposomale drug targeting tegen MT-MMP.

## Conclusies

MMPs hebben belangrijke functies bij fysiologische- en pathologische processen zoals chronische ontstekingen en maligniteiten. Het expressiepatroon van MMPs varieert tussen verschillende tumortypen en stadia in het ziekteproces en meerdere MMPs, onder meer MMP-2 bij het maagcarcinoom, zijn onafhankelijk van klinische of histologische factoren geassocieerd met prognose. Het concept van MMP inhibitie als werkzame behandeling bij maligniteiten kon tot op heden nog niet vastgesteld worden als gevolg van dosisremmende toxiciteit, het onderzoeken bij een te ver voortgeschreden ziekteproces, en een gebrek aan bewijs dat brede MMP inhibitie resulteert in vertraging van ziekteprogressie en verbetering van de overleving.

Het verdient aanbeveling om te onderzoeken of bij het maagcarcinoom door middel van een bepaling van het MMP-profiel ten tijde van het stellen van de diagnose (bijvoorbeeld door het bepalen van eiwitniveaus in biopten uit de tumor en het bepalen van relevante genpolymorfismen in DNA uit perifere leucocyten) subgroepen van patiënten geïdentificeerd kunnen worden met een slechte prognose. Vervolgens dient dan beoordeeld te worden welke subgroepen van patiënten het meest profijt hebben van neo-adjuvante chemotherapie en adjuvante chemoradiatietherapie. Bij klinisch onderzoek naar de effectiviteit van de semi-selectieve MMP inhibitoren die op dit moment ontwikkeld worden ligt het voor de hand te stratificeren voor deze subgroepen.