

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/30775> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Reimers, Marlies Suzanne

Title: Prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer. Towards precision medicine

Issue Date: 2015-01-08

CHAPTER 11

Nederlandse Samenvatting



Het carcinoom van de dikke darm en endeldarm (colorectaal carcinoom, CRC) staat op de derde plaats van meest voorkomende tumoren wereldwijd en is tevens een van de grootste veroorzakers van kanker-gerelateerde sterfte^{1,2}. Ongeveer 20-25% van de patiënten presenteren zich al met een gemetastaseerde ziekte tijdens diagnose en 20-25% van de patiënten ontwikkelen metastasen tijdens de progressie van deze ziekte, wat resulteert in een mortaliteit van 40-45%^{3,4}.

CRC ontstaat meestal spontaan, in 5% van de gevallen is het erfelijk, via een stapsgewijs proces van maligne ontaarding van gezonde cellen tot carcinoom, ook wel de adenoma-carcinoma sequentie genoemd⁵. Een aantal jaar geleden werd duidelijk dat tumorcellen voor deze maligne ontaarding zes biologische eigenschappen moeten verkrijgen, de zogenaamde 'hallmarks of cancer'⁶. Deze eigenschappen zijn autonomie van groesignalen, ongevoeligheid voor groei-remmende signalen, invasieve groei en metastasering, immortaliteit, aanhoudende vaatnieuwvorming en ongevoeligheid voor apoptose (geprogrammeerde celdood). Recentelijk werden nog 2 belangrijke aanvullende eigenschappen erkend; reprogrammeren van het energiemetabolisme en ontsnappen aan herkenning door het immuunsysteem⁷. Tevens werd de rol van het micromilieu rondom de tumor, die verantwoordelijk is voor het verkrijgen van deze eigenschappen, erkend. Genetische instabiliteit in een cel is verantwoordelijk voor het verkrijgen van deze tumoreigenschappen.

De belangrijkste pijler van behandeling van CRC is chirurgische verwijdering van de tumor met meenemen van bijbehorende lymfeklieren. De laatste decennia heeft de behandeling van colorectaal carcinoom zich sterk ontwikkeld. Mede door de introductie van nieuwe operatietechnieken, zoals de Totale Mesorectale Excisie (TME) bij rectumcarcinoom, preoperatieve radiotherapie bij rectumcarcinoom en adjuvante chemotherapie is de overleving van patiënten met CRC sterk verbeterd. Recent zijn er ook aanwijzingen gevonden dat behandeling met aspirine een remmende werking op tumorvorming en een positieve invloed op de overleving van patiënten met CRC heeft⁸⁻¹⁵.

Tegenwoordig wordt de keuze voor een bepaalde operatie en aanvullende therapie sterk beïnvloed door tumorstadiëring en locatie van de tumor. Echter, ongeveer 20-25% van de patiënten, die door een lage tumorstadiëring geen aanvullende therapie hebben gekregen, krijgen toch terugkeer van de ziekte binnen vijf jaar na diagnose¹⁶. Tevens kunnen de nieuwe aanvullende behandelingen voor aanzienlijke bijwerkingen zorgen en weten we uit onderzoek dat niet iedere patiënt baat heeft bij een bepaalde aanvullende therapie. Deze tekortkomingen in het huidige gebruik van tumorstadiëring kunnen resulteren in zowel onderbehandeling als overbehandeling van patiënten. Tumorstadiëring is daarom niet een optimaal beslismodel om de prognose van een patiënt te voorspellen en patiënten te selecteren voor aanvullende therapie. Huidige inzichten laten zien dat de onderliggende biologie van CRC ook invloed heeft op de prognose van de patiënt en het slagen van een aanvullende behandeling. Op basis van

zogenaamde biomarkers, die een weergave vormen van de onderliggende biologie en daarmee de kans op tumorgroei en metastasering reflecteren, kan een accurate voorspelling worden gedaan over de prognose van de patiënt (prognostische biomarkers) of het slagen van een behandeling (predictieve biomarkers). De groei van een tumor zou optimaal voorspeld kunnen worden door een combinatie van klinische, pathologische en biologische tumorkarakteristieken, resulterend in een optimale gepersonaliseerde behandeling.

Dit proefschrift richt zich op sleutelbiomarkers vanuit de moleculaire biologie van CRC, waarmee een voorspelling kan worden gedaan over de prognose van een patiënt en het slagen van een behandeling.

DEEL EEN: PROGNOSTISCHE BIOMARKERS IN COLORECTAAL CARCINOOM

Met behulp van prognostische biomarkers, die betrokken zijn bij maligne ontaarding van darmepitheelcellen en progressie van tumoren, kan een voorspelling worden gedaan over de prognose van een patiënt na resectie van de primaire tumor. Om dit te onderzoeken hebben we enkele biomarkers geselecteerd die behoren tot de 'hallmarks of cancer', zoals hierboven beschreven.

In **hoofdstuk 2 en 3** hebben we de prognostische waarde van belangrijke biomarkers, die gerelateerd zijn aan het immuunsysteem, in zowel coloncarcinoom als rectumcarcinoom onderzocht. Door middel van immunohistochemische kleuringen werd de tumorexpressie van Humaan Leukocyt Antigeen (HLA) klasse I, HLA-E en HLA-G en tumorinfiltratie van immunosuppressieve regulatoire T-cellen (Tregs) in kaart gebracht, met als doel het ontrafelen van ontsnappingsmechanismen van de tumor aan herkenning door het immuunsysteem. Er zijn aanwijzingen dat door genetische instabiliteit varianten van tumorcellen ontstaan, die een grotere kans hebben om aan het immuunsysteem te ontsnappen ('immunoediting'). Deze tumorcellen kunnen vervolgens verder uitgroeien en metastaseren¹⁷⁻²⁰. Een aantal mechanismen zijn daarvoor verantwoordelijk. HLA klasse I moleculen presenteren antigenen aan cytotoxische T-lymphocyten (CTL), die hierdoor schadelijke cellen voor het lichaam, zoals tumorcellen, kunnen herkennen en opruimen. Verminderde expressie van HLA klasse I op tumorcellen kan er dus voor zorgen dat deze cellen niet meer worden herkend en ontsnappen aan vernietiging door CTL²¹. Tumorcellen kunnen naast het verminderen van de HLA klasse I expressie op hun celmembraan HLA-G tot expressie brengen. HLA-G komt zelden voor in gezonde weefsels, maar vertoont wel expressie in tumoren²². HLA-E is daarentegen wel aanwezig op verscheidene gezonde weefsels en correleert met expressie van HLA klasse I²³. Onderzoek heeft aangetoond dat tumorexpressie van HLA-E en HLA-G ervoor zorgt dat natural-killer (NK) cellen niet geactiveerd worden, waardoor tumorcellen nog verder

kunnen ontsnappen aan het immuunsysteem²³⁻²⁵. Tenslotte kan infiltratie met Tregs in het micromilieu rondom de tumor zorgen voor remming van de activiteit van CTL^{26;27}.

In 285 'stadium I-IV' patiënten met coloncarcinoom (**hoofdstuk 2**) was totale tumorafschakeling van HLA klasse I gerelateerd aan een betere overleving. Deze bevinding zou kunnen worden verklaard doordat deze tumorcellen, zodra ze metastaseren naar de bloedbaan, opgeruimd worden door NK-cellen^{28;29}. Wanneer we de immuunmarkers combineerden in de statistische analyse zagen we 3 verschillende overlevingsgroepen ontstaan, die van significant prognostische waarde waren. Totale afschakeling van HLA klasse I in combinatie met afwezigheid van HLA-E en HLA-G op de tumor was geassocieerd met de beste overleving. Door afwezigheid van HLA-E en HLA-G op de tumorcel werden deze tumoren waarschijnlijk nog beter opgeruimd door NK-cellen^{24;25}. Patiënten met tumoren met verminderde expressie van HLA klasse I en weinig infiltratie van Tregs waren geassocieerd met de slechtste overleving. Deze tumoren zijn waarschijnlijk door activiteit van CTL veranderd in een tumorvariant met verminderde expressie van HLA klasse I, zodat ze verder kunnen ontsnappen aan herkenning door het immuunsysteem. Hierdoor kunnen deze tumorcellen nu niet goed meer door CTL opgeruimd worden, resulterend in verdere groei of metastasering van de tumorcellen. De afwezigheid van Tregs in deze tumoren versterkt onze hypothese aangezien CTL en Tregs tegengestelde werkingsmechanismen vertonen³⁰. In deze tumoren met een slechte prognose zijn Tregs waarschijnlijk niet noodzakelijk, omdat de aanwezigheid van CTL activiteit schaars is. Doordat er nog partiële expressie van HLA klasse I aanwezig is kunnen deze tumoren mogelijk ook niet goed opgeruimd worden door NK-cellen.

In **hoofdstuk 3** hebben we de prognostische waarde van dezelfde biomarkers, wederom onafhankelijk van elkaar en gecombineerd, in 495 rectumtumoren van de Nederlandse TME-studie onderzocht. Zowel expressie van HLA klasse I als een hoge Treg infiltratie was geassocieerd met een betere overleving. Interessant was dat ook een sterke HLA-G expressie geassocieerd was met een betere overleving. Dit resultaat is opmerkelijk, aangezien expressie van HLA-G als secundair ontsnappingsmechanisme NK-cellen kan remmen om tumorcellen met verminderde expressie of totale afschakeling van HLA klasse I op te ruimen^{24;25}. De reden hiervoor is onduidelijk. Immuun-regulatie in tumorcellen blijft een complex fenomeen, waarvan nog niet alle immuun-gerelateerde ontsnappingsmechanismen in kaart gebracht zijn. Mogelijk speelt HLA-G geen grote rol in rectumcarcinoom. Wanneer de immuunmarkers werden gecombineerd in de statistische analyse, zagen we wederom 3 overlevingsgroepen ontstaan. De prognose van de patiënt nam toe bij toename van het aantal markers die waren gerelateerd aan een goede prognose, zoals expressie van HLA klasse I, hoge Treg infiltratie en expressie van HLA-G. Interessant was dat patiënten met tumoren met totale afschakeling van HLA klasse I, expressie van HLA-G en weinig infiltratie met Tregs de slechtste prognose hadden. Deze tumoren hebben zich mogelijk zodanig aangepast dat ze goed kunnen

ontsnappen aan het immuunsysteem. Door verlies van HLA-expressie is er geen herkenning door CTL en door expressie van HLA-G ook geen opruiming van de tumorcellen door NK-cellen. HLA-G lijkt in deze fase van 'immunoediting', wanneer HLA klasse I totaal afgeschakeld is, wel een belangrijke rol in de overleving van tumorcellen te spelen.

De uitgevoerde studies tonen aan dat er waarschijnlijk verschillen bestaan tussen coloncarcinoom en rectumcarcinoom. De meeste studies die onderzoek hebben gedaan naar de relatie tussen immuunmarkers en prognose hebben deze studies uitgevoerd in patiënten-cohorten met zowel rectumtumoren als colontumoren^{31;32}. Deze studies laten vaak zien dat totale afschakeling geassocieerd is met een betere overleving. Echter, in rectumcarcinoom was HLA-expressie gerelateerd aan een betere overleving. Mogelijk zijn biologische verschillen tussen rectum en colon verantwoordelijk voor deze verschillen. Een van de biologische verschillen tussen rectum- en colontumoren is het fenomeen microsatellietinstabiliteit (MSI). Ongeveer 50% van de proximale coloncarcinomen vertonen MSI, terwijl bijna alle tumoren in het rectum juist microsatellietstabiele (MSS) tumoren zijn^{33;34}. MSI is geassocieerd met totale afschakeling van HLA klasse I en een betere overleving, wat de resultaten kan vertroebelen^{35;36}. Daarom is het noodzaak om, wanneer naar HLA klasse I expressie gekeken wordt in colorectale tumoren, de microsatellietstatus van de tumor in acht te nemen. Helaas was het aantal patiënten met MSI-tumoren in ons coloncarcinoomcohort te klein om separate analyses in MSI- en MSS-tumoren uit te voeren.

In **hoofdstuk 4** hebben we de prognostische waarde van biomarkers die gerelateerd zijn aan apoptose en proliferatie onderzocht. Een disbalans tussen deze twee processen kan bijdragen aan het ontstaan en onderhouden van tumorgroei en -ontwikkeling^{6;7}. Verschillende studies laten tegenstrijdige resultaten zien wanneer gekeken wordt naar de prognostische waarde van apoptose of proliferatie, met name tussen tumoren afkomstig van het colon of rectum³⁷⁻⁴⁰. Ook lijkt er sprake te zijn dat de microsatellietstatus van invloed kan zijn op deze processen^{39;41;42}. In 285 'stadium I-IV' patiënten met coloncarcinoom hebben we de mate van apoptose en proliferatie onderzocht door middel van immunohistochemische kleuringen met antilichamen tegen respectievelijk actief caspase-3 (een apoptose-inducerend enzym) en ki67 (proliferatiemarker). Deze studie liet zien dat patiënten met tumoren met zowel een sterke tumorcelproliferatie als apoptose de beste overleving hebben. Interessant was echter dat de uitkomst van deze studie varieerde met de locatie van de tumor en waarschijnlijk met de microsatellietstatus van de tumor. Helaas was het aantal MSI-tumoren in ons cohort te klein om separate analyses uit te voeren. Echter, MSI werd wel significant meer waargenomen in rechtszijdige tumoren. Een balans tussen apoptose en proliferatie (aanwezigheid van een sterke tumorcelproliferatie en aanwezigheid van apoptose, of afwezigheid van beide processen) was geassocieerd met een betere overleving in linkszijdige colontumoren. Zoals je kan verwachten van sterk prolifererende tumoren, hadden patiënten met

linkszijdige tumoren waarin sprake was van een sterke proliferatie en afwezigheid van apoptose de slechtste overleving. In de rechtszijdige tumoren daarentegen, lieten de tumoren met een sterke proliferatie en afwezigheid van apoptose een betere overleving zien. Locatie van de tumor of tumormicrosatellietstatus hebben dus mogelijk invloed op de prognostische waarde van deze markers gezamenlijk. Eerder onderzoek heeft laten zien dat MSI-tumoren vaak veel proliferatie laten zien. Tevens vertonen MSI tumoren veel genmutaties, waardoor sprake is van een verhoogde productie van abnormale eiwitten^{41;42}. Dit leidt mogelijk tot een sterke immuunreactie met als gevolg toename van apoptose in de tumoren. De betere prognose van deze patiënten met rechtszijdige tumoren met een sterke proliferatie zou hierdoor kunnen worden verklaard⁴³. In de toekomst zullen deze resultaten gevalideerd moeten worden, waarbij rekening moet worden gehouden met de locatie en de microsatellietstatus van de tumor.

In **hoofdstuk 5** hebben we een validatie uitgevoerd van de 12-gene Colon Cancer Recurrence Score[®] Assay in 297 patiënten met rectumcarcinoom uit de Nederlandse TME-trial die een operatieve verwijdering van hun tumor hebben ondergaan, zonder preoperatieve bestraling. Deze test, die de expressie meet van 12 genen, was eerder al gevalideerd in meerdere trials in patiënten met stadium II coloncarcinoom^{44;45}. Gebaseerd op de expressie van de genen worden patiënten ingedeeld in 3 groepen; een laag risico, gemiddeld risico en hoog risico op terugkeer van de ziekte. In deze validatiestudie in rectumcarcinoom voorspelde de Recurrence Score[®] (RS) het risico op terugkeer van de ziekte, het risico op afstandsmetastasen en rectumcarcinoom-specifieke overleving. Het effect was het meest zichtbaar in stadium II rectumcarcinoom. RS zou in de toekomst mogelijk in de kliniek gebruikt kunnen worden om patiënten met een hoog of laag risico op terugkeer van de ziekte te selecteren voor respectievelijk wel of geen adjuvante chemotherapie.

DEEL TWEE: BEHANDELING VAN COLONCARCINOOM EN PREDICTIEVE BIOMARKERS

Onderzoek toont aan dat aspirinegebruik na de diagnose de overleving en mortaliteit van patiënten met CRC sterk verbetert^{9-11;46}. In **hoofdstuk 6** hebben we het effect van aspirinegebruik (80 mg) na de diagnose op de overleving onderzocht door een subanalyse te verrichten in ouderen (≥ 70 jaar) met coloncarcinoom uit het cohort dat eerder is gebruikt door Bastiaannet *et al.*⁴⁶. In deze studie was aspirinegebruik na de diagnose significant geassocieerd met een sterk verbeterde overleving in ouderen met coloncarcinoom vergeleken met niet-gebruikers. Al deze studies impliceren dat het goed getolereerde en goedkope aspirine mogelijk gebruikt kan worden als een nieuwe

adjuvante therapie, wat zeker bij ouderen met colon carcinoom een grote klinische doorbraak zal zijn.

Het exacte mechanisme achter dit fenomeen is nog niet bekend. Mogelijk spelen bepaalde enzymen en genen daarbij een rol, waaronder het enzym COX-2 (cyclooxygenase-2), COX-1 (cyclooxygenase-1) en het gen *PIK3CA*. COX-1 is verantwoordelijk voor trombocytenuitstrooming door productie van TXA₂ in trombocyten, waarop aspirine aangrijpt⁴⁷. COX-2 is een enzym dat betrokken is bij de prostaglandine productie en maligne ontaarding van epitheliale cellen, wat kan worden geremd door aspirine^{48;49}. Ongeveer 70% van de CRCs vertonen expressie van COX-2⁹. Recent onderzoek liet echter ook zien dat aspirine mogelijk tumorgroei remt en apoptose induceert door het blokkeren van de fosfatidylinositol 3-kinase (*PIK3CA*) signaleringroute, die verantwoordelijk is voor de aansturing van COX-2⁵⁰. Deze route speelt een belangrijke rol in tumorgroei en progressie⁵¹. In 15-20% van de CRCs worden mutaties in het *PIK3CA* gevonden. Aspirine zou mogelijk alleen een positieve invloed hebben op de overleving van patiënten met een CRC indien er sprake is van een *PIK3CA*-mutatie in de tumor⁵² of verhoogde expressie van COX-2⁹.

Omdat aspirinegebruik gepaard kan gaan met negatieve bijwerkingen bij de patiënt en mogelijk kan resulteren in overbehandeling, hebben we in **hoofdstuk 7** onderzoek gedaan naar predictieve biomarkers die kunnen voorspellen welke patiënten met coloncarcinoom baat hebben bij aspirinetherapie na de diagnose. In de bloedbaan kan het metastaseringsvermogen van tumorcellen worden beïnvloed door omgevingsfactoren, waaronder trombocyten en cellen afkomstig van het beenmerg⁵³. Zodra tumorcellen de bloedbaan binnen dringen, komen ze in contact met trombocyten⁵⁴. Er wordt gedacht dat trombocyten metastaserende tumorcellen in de bloedbaan beschermen tegen immuuncellen, zoals NK-cellen. Doordat trombocyten als het ware een schild vormen rondom tumorcellen wordt de NK-reactiviteit beïnvloed⁵⁵. De interactie tussen tumorcellen en trombocyten resulteert in verplaatsing van HLA klasse I expressie van de trombocyt naar het celmembraan van de tumorcel, resulterend in een HLA klasse I fenotype. Hierdoor wordt NK-cel activiteit geblokkeerd. Doordat HLA klasse I afkomstig is van de trombocyt, wat niet als lichaamsvreemd herkend wordt, worden CTL ook niet geactiveerd⁵⁵.

Aspirine remt de trombocytenuitstrooming⁴⁷ en aannemelijk is dat het schild van trombocyten rondom de tumorcel ook geremd wordt, met als gevolg dat trombocyten de metastaserende tumorcellen niet meer kunnen beschermen tegen afbraak door immuuncellen, zoals de NK-cellen. NK-cellen herkennen en elimineren bij voorkeur cellen met totale afschakeling of verminderde expressie van HLA klasse I⁵⁵. De hypothese van deze studie was dan ook dat de overlevingswinst van aspirinegebruik na de diagnose coloncarcinoom geassocieerd is met tumoren met totale afschakeling of verminderde expressie van HLA klasse I. Echter, in strijd met onze hypothese, vonden we in deze

studie, waarbij tumorweefsel van 999 patiënten met coloncarcinoom beschikbaar was, dat aspirinegebruik na de diagnose alleen een positieve invloed heeft op overleving indien er sprake is van HLA expressie op de tumor. Er zijn twee mogelijke verklaringen voor dit fenomeen. Ten eerste zou aspirinegebruik kunnen zorgen voor verstoring van trombocyten, waardoor tumorcellen met HLA klasse I nu meer toegankelijk worden voor CTL activiteit. Ten tweede zorgt direct contact tussen trombocyten en tumorcellen voor secretie van TGF- β en activatie van de NF- κ B signaleringsroute, wat resulteert in een epitheliaal-mesenchymaal fenotype met een verhoogd metastaseringsvermogen van de circulerende tumorcellen⁵³. Aspirine zou de NF- κ B signalering tussen trombocyten en tumorcellen, die mogelijk afhankelijk is van een intacte HLA klasse I expressie, kunnen remmen. Hierdoor kan de epitheliale-mesenchymale transitie in circulerende tumorcellen worden voorkomen met als gevolg een vermindering van het metastaseringsvermogen.

Onze studie heeft niet kunnen bevestigen dat aspirinegebruik alleen een positief effect heeft op de overleving van patiënten met coloncarcinoom wanneer er sprake is van verhoogde COX-2 expressie of een *PIK3CA* mutatie. Een farmacologische oorzaak kan daaraan ten grondslag liggen. Farmacologische studies naar het gebruik van aspirine tonen aan dat een lage dosis (80 mg), die gebruikt is in onze studie, niet genoeg is om permanent COX-2 te acetyleren, maar wel de optimale dosis is voor trombocyten remming⁵⁶. In de studies die hebben aangetoond dat *PIK3CA* en COX-2 expressie predictieve biomarkers zijn voor de positieve invloed van aspirinegebruik in CRC was de dosis 325 mg^{57;58}.

Mogelijk heeft aspirine meerdere werkingsmechanismen in CRC; een direct effect op trombocyten door remming van COX-1, nodig voor het remmen van metastasering en waarvoor een lage dosering aspirine genoeg is; en een tweede mechanisme dat in de weefsels COX-2 expressie remt, waarvoor een hogere en meer frequente dosering nodig is.

DEEL DRIE: GEPERSONALISEERDE BEHANDELING VAN COLORECTAAL CARCINOOM

De huidige classificering middels de TNM stadiëring, waarbij rekening wordt gehouden met de tumor zelf (T), de betrokken lymfeklieren (N) en metastasering op afstand (M), blijkt niet een optimaal handvat te zijn voor artsen om een bepaalde behandelingsstrategie te bepalen. Het is daarom belangrijk om additionele biomarkers te vinden die de huidige tumorstadiëring kunnen verbeteren. Met gebruik van biomarkers naast de bestaande tumorstadiëring zou de prognose van een patiënt beter kunnen worden ingeschat en de behandeling worden geoptimaliseerd. Het uiteindelijke doel van de ontdekking en ontwikkeling van al deze klinische prognostische en predictieve

biomarkers is een optimaal multidisciplinair bepaalde behandeling gericht op de individuele patiënt. Deze gepersonaliseerde behandeling integreert moleculaire en klinische tumoreigenschappen met patiëntkarakteristieken. (Epi)genetische eigenschappen en externe factoren worden samen met patiëntkarakteristieken bestudeerd, waardoor de ziekteprogressie van een individuele patiënt beter in kaart kan worden gebracht en betere preventieve, diagnostische en therapeutische methoden kunnen worden ontwikkeld.

Helaas worden, ondanks een enorme overvloed aan gepubliceerd onderzoek naar biomarkers, in de praktijk op aanvraag slechts enkele biomarkers gebruikt. Voorbeelden hiervan zijn *KRAS* en *BRAF* om te bepalen of een patiënt met gemetastaseerd CRC geschikt is voor behandeling met cetuximab of panitumumab, MSI voor het bepalen van het erfelijke Lynch syndroom en de *Oncotype DX* Colon Cancer Assay om te bepalen of aanvullende behandeling in stadium II en III coloncarcinoom wenselijk kan zijn. In **hoofdstuk 8** hebben we een overzicht gemaakt van de meest bestudeerde biomarkers in CRC. Echter, de meeste biomarkers worden, ondanks de mooie resultaten die zijn gepubliceerd, niet gebruikt in de kliniek. Het gebrek aan consensus in de patiënten selectiecriteria en het uitvoeren van studies, en de afwezigheid van validatie studies zijn mogelijke oorzaken die hieraan ten grondslag liggen. De moeilijkheden en controverses die gepaard gaan met de klinische introductie van een biomarker worden verder in dit hoofdstuk besproken. Uit dit overzicht hebben we moeten concluderen dat er op dit moment onvoldoende bewijs is om naast *KRAS*, *BRAF*, MSI en *Oncotype DX* andere biomarkers in de kliniek te gebruiken.

In de toekomst zou een stappenplan voor de klinische introductie van een biomarker kunnen worden gebruikt om dit probleem op te lossen⁵⁹. De eerste stap van dit programma zou bestaan uit ontwikkeling van een biomarker in een preklinische exploratieve setting, gevolgd door verificatie van de biomarker in een grote retrospectieve studie, validatie en uiteindelijk bevestiging van de waarde van de biomarker in een prospectieve gerandomiseerde trial. Tevens zou een combinatie van biomarkers meer prognostische en predictieve waarde kunnen bieden dan het gebruik van één enkele biomarker.

De laatste jaren heeft genotypering ook een veelbelovende voet aan de grond gekregen in de behandeling van CRC, waarbij met name de risicopredictie en de behandelingsstrategie van de individuele patiënt centraal staan. Alhoewel de toegevoegde waarde van genotypering voor het bepalen van systemische therapie duidelijk lijkt, zoals ook beschreven in hoofdstuk 5, is de impact van genotypering op chirurgisch vlak onduidelijk. In **hoofdstuk 9** wordt de rol van genotypering in de chirurgische besluitvorming bediscussieerd. Behoudens enkele afzonderlijke genetische mutaties die een directe invloed hebben op chirurgisch ingrijpen, zoals *BRCA* mutaties in borstkanker waarvoor een profylactische bilaterale mastectomie wordt geadviseerd, is er tot op he-

den geen directe relatie tussen genotypering en chirurgische besluitvorming. Indirect kan genotypering echter wel invloed hebben op de chirurgische besluitvorming. Genotypering van een preoperatief biopt kan leiden tot een gerichte neo-adjuvante therapie, leidend tot een mogelijke tumorregressie, met als gevolg dat de timing en omvang van de operatie worden beïnvloed. Indien door een gerichte neo-adjuvante therapie complete remissie van de tumor optreedt, zou zelfs een 'wait-and-see' benadering tot de mogelijkheden behoren. Echter, voordat genotypering een duidelijk rol zal spelen in de chirurgische besluitvorming zal er eerst meer duidelijkheid moeten zijn over hoe een complete remissie wordt vastgesteld, hoeveel tijd er tussen de gegeven gerichte therapie en het vaststellen van het therapie effect moet zitten, wat de lange termijn effecten van deze strategie zijn en wanneer de operatie na deze gerichte neo-adjuvante therapie moet plaatsvinden.

Om uiteindelijk de veelbelovende gepersonaliseerde behandeling met behulp van biomarkers en genotypering van kankerpatiënten te bereiken, moeten belangrijke stappen worden genomen. Ten eerste is het, zoals hierboven beschreven, voor de ontwikkeling en validatie van biomarkers en genotyperingsprofielen belangrijk om gestandaardiseerde methoden en vergelijkbare patiëntcohorten te gebruiken, waarmee de integratie in de kliniek verbeterd kan worden. Ten tweede is het in onze vergrijzende populatie ook niet onbelangrijk om het fenotype van een patiënt in acht te nemen. Zowel de comorbiditeiten van oudere patiënten als de invloed van deze comorbiditeiten op de tumor moeten worden meegenomen in een gewogen patiëntgerichte behandelingsstrategie. Tenslotte is het van groot belang dat alle specialisten die betrokken zijn bij kankerbehandeling hun krachten nog verder bundelen, waardoor de reeds bestaande multidisciplinaire behandeling van tumoren verder uitgebreid kan worden met kennis op het gebied van tumorbiologie. Door inachtneming van deze belangrijke factoren zal in de toekomst aan iedere individuele patiënt de meest efficiënte en draaglijke behandeling kunnen worden geboden.

REFERENCE LIST

- (1) Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893-2917.
- (2) Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90.
- (3) La Vecchia C., Bosetti C, Lucchini F et al. Cancer mortality in Europe, 2000-2004, and an overview of trends since 1975. *Ann Oncol* 2010;21:1323-1360.
- (4) Malvezzi M, Arfe A, Bertuccio P, Levi F, La VC, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2011. *Ann Oncol* 2011;22:947-956.
- (5) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-532.
- (6) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
- (7) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-674.
- (8) Algra AM, Rothwell PM. Effects of regular aspirin on long-term cancer incidence and metastasis: a systematic comparison of evidence from observational studies versus randomised trials. *Lancet Oncol* 2012;13:518-527.
- (9) Chan AT, Ogino S, Fuchs CS. Aspirin use and survival after diagnosis of colorectal cancer. *JAMA* 2009;302:649-658.
- (10) Langley RE, Burdett S, Tierney JF, Cafferty F, Parmar MK, Venning G. Aspirin and cancer: has aspirin been overlooked as an adjuvant therapy? *Br J Cancer* 2011;105:1107-1113.
- (11) McCowan C, Munro AJ, Donnan PT, Steele RJ. Use of aspirin post-diagnosis in a cohort of patients with colorectal cancer and its association with all-cause and colorectal cancer specific mortality. *Eur J Cancer* 2013;49:1049-1057.
- (12) Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* 2010;376:1741-1750.
- (13) Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* 2011;377:31-41.
- (14) Rothwell PM, Wilson M, Price JF, Belch JF, Meade TW, Mehta Z. Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials. *Lancet* 2012;379:1591-1601.
- (15) Rothwell PM, Price JF, Fowkes FG et al. Short-term effects of daily aspirin on cancer incidence, mortality, and non-vascular death: analysis of the time course of risks and benefits in 51 randomised controlled trials. *Lancet* 2012.
- (16) Davies M, Arumugam PJ, Shah VI et al. The clinical significance of lymph node micrometastasis in stage I and stage II colorectal cancer. *Clin Transl Oncol* 2008;10:175-179.
- (17) Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002;3:991-998.
- (18) Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004;21:137-148.
- (19) Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004;22:329-360.
- (20) Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006;6:836-848.

- (21) Cavallo F, De GC, Nanni P, Forni G, Lollini PL. 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2011;60:319-326.
- (22) Wischhusen J, Waschbisch A, Wiendl H. Immune-refractory cancers and their little helpers—an extended role for immunetolerogenic MHC molecules HLA-G and HLA-E? *Semin Cancer Biol* 2007; 17:459-468.
- (23) Palmisano GL, Contardi E, Morabito A, Gargaglione V, Ferrara GB, Pistillo MP. HLA-E surface expression is independent of the availability of HLA class I signal sequence-derived peptides in human tumor cell lines. *Hum Immunol* 2005;66:1-12.
- (24) Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat Immunol* 2002;3:999-1005.
- (25) Wischhusen J, Waschbisch A, Wiendl H. Immune-refractory cancers and their little helpers—an extended role for immunetolerogenic MHC molecules HLA-G and HLA-E? *Semin Cancer Biol* 2007; 17:459-468.
- (26) Noshok K, Baba Y, Tanaka N et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol* 2010;222:350-366.
- (27) Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006;6:715-727.
- (28) Hokland M, Kuppen PJ. Natural killer cells: from “disturbing” background to central players of immune responses. *Mol Immunol* 2005;42:381-383.
- (29) Menon AG, Morreau H, Tollenaar RA et al. Down-regulation of HLA-A expression correlates with a better prognosis in colorectal cancer patients. *Lab Invest* 2002;82:1725-1733.
- (30) Liu F, Lang R, Zhao J et al. CD8(+) cytotoxic T cell and FOXP3(+) regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat* 2011;130:645-655.
- (31) Sandel MH, Speetjens FM, Menon AG et al. Natural killer cells infiltrating colorectal cancer and MHC class I expression. *Mol Immunol* 2005;42:541-546.
- (32) Watson NF, Ramage JM, Madjd Z et al. Immunosurveillance is active in colorectal cancer as down-regulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *Int J Cancer* 2006;118:6-10.
- (33) Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005;23:609-618.
- (34) Soreide K, Janssen EA, Soiland H, Korner H, Baak JP. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg* 2006;93:395-406.
- (35) Dierssen JW, de Miranda NF, Ferrone S et al. HNPCC versus sporadic microsatellite-unstable colon cancers follow different routes toward loss of HLA class I expression. *BMC Cancer* 2007;7:33.
- (36) Mouradov D, Domingo E, Gibbs P et al. Survival in stage II/III colorectal cancer is independently predicted by chromosomal and microsatellite instability, but not by specific driver mutations. *Am J Gastroenterol* 2013.
- (37) de Bruin EC, van de Velde CJ, van de Pas S et al. Prognostic value of apoptosis in rectal cancer patients of the dutch total mesorectal excision trial: radiotherapy is redundant in intrinsically high-apoptotic tumors. *Clin Cancer Res* 2006;12:6432-6436.
- (38) de Heer P, de Bruin EC, Klein-Kranenburg E et al. Caspase-3 activity predicts local recurrence in rectal cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:5810-5815.
- (39) Jonges LE, Nagelkerke JF, Ensink NG et al. Caspase-3 activity as a prognostic factor in colorectal carcinoma. *Lab Invest* 2001;81:681-688.
- (40) Takano Y, Saegusa M, Ikenaga M, Mitomi H, Okayasu I. Apoptosis of colon cancer: comparison with Ki-67 proliferative activity and expression of p53. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996;122:166-170.

- (41) Kim GP, Colangelo LH, Wieand HS et al. Prognostic and predictive roles of high-degree microsatellite instability in colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *J Clin Oncol* 2007;25:767-772.
- (42) Okon K, Demczuk S, Klimkowska A et al. Correlation of microsatellite status, proliferation, apoptotic and selected immunohistochemical markers in colorectal carcinoma studied with tissue microarray. *Pol J Pathol* 2006;57:105-111.
- (43) Dolcetti R, Viel A, Doglioni C et al. High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol* 1999;154:1805-1813.
- (44) Gray RG, Quirke P, Handley K et al. Validation study of a quantitative multigene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for assessment of recurrence risk in patients with stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:4611-4619.
- (45) O'Connell MJ, Lavery I, Yothers G et al. Relationship between tumor gene expression and recurrence in four independent studies of patients with stage II/III colon cancer treated with surgery alone or surgery plus adjuvant fluorouracil plus leucovorin. *J Clin Oncol* 2010;28:3937-3944.
- (46) Bastiaannet E, Sampieri K, Dekkers OM et al. Use of Aspirin postdiagnosis improves survival for colon cancer patients. *Br J Cancer* 2012.
- (47) Ofosu FA. Appropriate Assessment of the Functional Consequences of Platelet Cyclooxygenase-1 Inhibition by Aspirin in vivo. *Thromb Res* 2013.
- (48) Herschman HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* 1996;1299:125-140.
- (49) Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971;231:232-235.
- (50) Uddin S, Ahmed M, Hussain A et al. Cyclooxygenase-2 inhibition inhibits PI3K/AKT kinase activity in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 2010;126:382-394.
- (51) Samuels Y, Wang Z, Bardelli A et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004;304:554.
- (52) Liao X, Lochhead P, Nishihara R et al. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med* 2012;367:1596-1606.
- (53) Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* 2011;20:576-590.
- (54) Reymond N, d'Agua BB, Ridley AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer* 2013;13:858-870.
- (55) Placke T, Orgel M, Schaller M et al. Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res* 2012;72:440-448.
- (56) Bruno A, Dovizio M, Tacconelli S, Patrignani P. Mechanisms of the antitumoural effects of aspirin in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2012;26:e1-e13.
- (57) Chan AT, Ogino S, Fuchs CS. Aspirin use and survival after diagnosis of colorectal cancer. *JAMA* 2009;302:649-658.
- (58) Liao X, Lochhead P, Nishihara R et al. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med* 2012;367:1596-1606.
- (59) Pepe MS, Etzioni R, Feng Z et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1054-1061.

