



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Improving diagnostic, prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer: the role of proteomics and stromatogenesis

Huijbers, A.

Citation

Huijbers, A. (2022, June 2). *Improving diagnostic, prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer: the role of proteomics and stromatogenesis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3307244>

Version: 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/1887/3307244>

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

8



Nederlandse samenvatting
List of Publications
Curriculum Vitae
Dankwoord

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Darmkanker is een van de meest voorkomende vormen van kanker. Bij vrouwen staat het na borstkanker op de tweede plaats en bij mannen na long en prostaat­kanker op de derde plaats. Bovendien is het de derde en vierde belangrijkste oorzaak van kanker gerelateerde sterfgevallen bij respectievelijk vrouwen en mannen [1].

Vroege opsporing is cruciaal. Darmkanker ontstaat door een langzame ontwikkeling van normaal darmslijmvlies naar afwijkend slijmvlies, vaak begint het bijvoorbeeld met een poliep die uit kan groeien naar darmkanker. Het vermoedelijke verloop van darmkanker (de prognose) hangt voornamelijk af van hoe ver de kanker is gevorderd: het zogenoemde tumor­stadium. Daarom is het vroege opsporen van groot belang om de overlevingskansen van mensen met darmkanker te verbeteren [2, 3].

De kans op het overleven van darmkanker is de laatste jaren toegenomen, enerzijds door het verbeteren van de vroege opsporing met behulp van het bevolkingsonderzoek en anderzijds door nieuwe en verbeterde behandelingen.

Het inschatten van het stadium van de tumor gebeurt op dit moment met behulp van het TNM stadium. T staat voor tumor, de mate van doorgroei van de tumor door de darmwand, N voor node = lymfklieren waar wel of geen uitzaaiingen in zitten en M voor metastase, eventuele uitzaaiingen in andere organen. Ondanks deze stadiëring zien we dat er grote verschillen te zien zijn in de overleving en ook terugkeer van ziekte bij patiënten die eigenlijk in dezelfde risico groep zitten. Dit suggereert dat er nog andere verschillen per tumor zijn waar we verder naar moeten kijken, zodat er een nog betere inschatting van de eigenschappen van de tumor per patiënt gemaakt kan worden [4]. Met als uiteindelijk doel de behandeling per patiënt zo af te stemmen op de specifieke tumor eigenschappen dat de uitkomsten nog beter worden.

In dit proefschrift analyseren we deze karakterisering van darmkanker. We richten ons daarbij op de rol van biomarkers. Een biomarker, ook wel biologische marker genoemd, is een meetbare indicator die zowel normale biologische processen, alsook bijvoorbeeld processen tijdens een ziekte kan weergeven [5].

Biomarkers worden vaak gedefinieerd in overeenstemming met hoe ze worden toegepast. Dit onderzoek richt zich op drie specifieke subtypes van biomarkers: diagnostische, prognostische en predictieve biomarkers en hun rol bij het verbeteren van de uitkomst van darmkanker.

Deel I Proteomics als diagnostische biomarker

In het eerste deel onderzoeken we de rol van proteomics als diagnostische biomarker voor vroege detectie van darmkanker. Proteomics is de studie van het proteoom: alle eiwitten (proteïnen) van een organisme of een deel van een organisme. Proteomics heeft als doel om zowel kwantitatief als kwalitatief alle functionele eiwitten van een organisme in kaart te brengen. Het is gebaseerd op het scheiden en nauwkeurig in kaart brengen van complexe eiwitmengsels. Zo kunnen bijvoorbeeld eiwitten met een veranderd expressiepatroon in bloed worden opgespoord en in verband worden gebracht met de aanwezigheid van een tumor.

Het gebruik van biomarkers in bloed om kankerpatiënten te onderscheiden van gezonde personen kan een hulpmiddel zijn om screeningsprogramma's te verbeteren. Bloed of serum (=bloedvloeistof waaruit rode en witte bloedcellen en bloedplaatjes zijn verwijderd) is een ideaal monstertype voor markers voor vroege opsporing, omdat het op een eenvoudige, gestandaardiseerde manier kan worden verkregen zonder hoge kosten of grote gezondheidsrisico's voor de patiënt. [6]

In **hoofdstuk 2** wordt een literatuuroverzicht gegeven van proteomics onderzoeken die het potentieel hebben om te worden geïmplementeerd in de kliniek en nationale screeningprogramma's voor darmkanker en borstkanker. In **hoofdstuk 3** hebben we een eiwit profiel in het serum geïdentificeerd met een hoog onderscheidend vermogen tussen darmkanker en gezond. Dit is geautomatiseerd geanalyseerd op een robot platform zodat het steeds exact op dezelfde manier gebeurt en er grote hoeveelheden samples tegelijk geanalyseerd kunnen worden. Het is een relatief eenvoudige en goedkope test die mogelijkheid heeft om de huidige darmkanker screening te verbeteren. Ondanks het hoge onderscheidende vermogen van dit profiel en de geautomatiseerde verwerking, zijn grotere studies echter essentieel om de 'tumorspecificiteit' van de verkregen discriminerende handtekeningen te evalueren. Met andere woorden of deze handtekening echt specifiek bij darmkanker past en niet een weerspiegeling is van bijvoorbeeld een meer algemeen ziekte proces. Dit blijft een grote uitdaging, echter voortdurende vooruitgang in bloedverwerking, meetmethoden en computer analyses zullen hopelijk de betrouwbare implementatie in een in de kliniek mogelijk maken.

Deel 2 Stromatogenese als een prognostische en voorspellende biomarker

In **hoofdstukken 4-6** onderzoeken we de rol van stromatogenese en de rol van de tumor-stroma ratio (TSR) als een prognostische en voorspellende biomarker. Stromatogenese is de vorming van (tumor) stroma, een soort bindweefsel. Er zijn veel soorten stroma vorming, zoals bijvoorbeeld littekenvorming bij de genezing van een

wond. Het type stroma waar dit onderzoek over gaat, bij kwaadaardige tumoren, is een heel ander soort weefsel.

De afgelopen jaren is duidelijk geworden dat de omgeving waarin tumorcellen zich bevinden, het tumor-stroma dat met name bestaat uit bindweefsel (fibroblasten), bloedvaten en immuuncellen, belangrijk is voor de tumor groei en de ontwikkeling van uitzaaiingen. Daarom kunnen tumor-stroma en kankercel-interacties sleutelementen zijn in de puzzel van tumoroverleving, groei, invasie en uitzaaiing [7]. Dit geeft aanknopingspunten voor eventuele nieuwe, beter op de patiënt afgestemde behandelmethoden.

Een prognostische biomarker die wij verder onderzoeken is de tumor-stroma ratio (TSR). Deze marker kan worden beoordeeld door eenvoudige microscopische analyse van weefselcoupes (stukjes van de tumor die na een operatie worden onderzocht). Dit weefsel wordt nu ook al standaard door de patholoog onder de microscoop bekeken. Het is dus één extra score naast de al standaard te scoren parameters. Deze analyse is snel, goedkoop en betrouwbaar. Eerder onderzoek door onze groep toonde aan dat de TSR bij patiënten met darmkanker een sterke onafhankelijke prognostische voorspeller is [8,9]. Patiënten met een hoog stromapercentage binnen de primaire tumor hebben een slechter ziektebeloop, ook wel een slechte prognose genoemd.

In **hoofdstuk 4** wordt de bevestiging (ook wel validatie genoemd) van de TSR als een prognostische biomarker in een grote studiepopulatie met 710 patiënten uit de VICTOR trial beschreven. Deze studie bevestigt dat de TSR een onafhankelijke sterke prognostische factor is. [10, 11]. Als er veel stroma weefsel aanwezig is in het meest invasieve deel van de tumor, dan is dit geassocieerd met een ongunstige prognose, onafhankelijk van andere prognostische parameters. Het meest invasieve deel van de tumor is de plek waar de tumor het diepst in de darmwand groeit of door de darmwand heen groeit. Zoals hierboven ook benoemd is het een eenvoudig te bepalen score naast de al te scoren parameters. Het is opmerkelijk dat een eenvoudige op weefsel gebaseerde parameter zo'n groot onderscheidend vermogen kan hebben zonder extra kosten. Het zou daarom van groot belang zijn om TSR naast de huidige classificatie in de dagelijkse routinediagnostiek te implementeren, om de prognostische uitkomst van darmkanker patiënten beter te voorspellen.

Hiermee is de slechtere prognose van patiënten met een hoge TSR opnieuw bevestigd. Er is echter nog geen geschikte therapie of zelfs geen aanknopingspunt voor nieuwe therapieontwikkelingen voor deze risicogroep. We hebben daarom het ontstaan van

stromaweefsel, het stromatogenese proces onderzocht om aanknopingspunten voor nieuwe behandelingsopties te ontdekken.

We weten dat tumor-stroma veel bloedvatvorming heeft en dat bloedvatvorming ook een mechanisme is dat de tumor kan helpen zich uit te breiden [12, 13]. Hierdoor was een van onze gedachten dat medicatie specifiek tegen bloedvatvorming (angiogenese) misschien goed zou werken voor deze patiëntengroep.

In **hoofdstuk 5** hebben we daarom de TSR in de QUASAR 2-studie geëvalueerd en het effect van anti-angiogenese medicatie (bevacizumab)[14].

Onze hypothese dat anti-angiogenese medicatie een betere ziekte vrije overleving zou opleveren binnen de TSR hoog groep kon helaas niet worden bevestigd. Ofwel onze groep patiënten met veel tumor-stroma in hun tumor hadden geen verbetering van hun prognose na behandeling met bevacizumab.

Wel werd ook in deze studie opnieuw bevestigd dat de TSR een onafhankelijke prognostische factor is voor darmkankerpatiënten. Daarnaast werd een significant slechtere overleving voor patiënten met vasculaire invasie (aanwezigheid van tumorcellen in de bloedvaten van de tumor) bevestigd.

Ook werd er een verband gezien tussen vasculaire invasie en de stroma-hoog groep, wat de voorspellende waarde van beide hoog risicofactoren ondersteunt. De relatie tussen patiënten met een stroma-hoge tumor en vasculaire invasie is niet eerder beschreven. Deze correlatie zou de belangrijke rol die angiogenese speelt in de stromale omgeving kunnen bevestigen en kan mogelijk toch een aanwijzing zijn voor het belang van een andere anti-angiogenese therapie dan bevacizumab bij deze patiëntengroep.

Evaluatie van de moleculaire architectuur van het tumor-geassocieerde stroma bij patiënten met darmkanker

Om de overlevingsverbetering van darmkankerpatiënten effectief aan te pakken, is het van groot belang om te begrijpen waarom patiënten met een hoog stromapercentage een slechte prognose hebben, wat de agressiviteit van veel stroma vorming veroorzaakt en welke stappen bij dit proces betrokken zijn. Om de architectuur van het tumor-geassocieerde stromaweefsel te evalueren, wordt in **hoofdstuk 6** een studie beschreven waarbij we met een specifieke laser techniek (laser capture microdissectie) de stroma cellen heel gedetailleerd selecteren uit het tumor weefsel. Hierbij worden zowel bij stroma laag als stroma hoog weefsel monsters alle stroma cellen geselecteerd en geïsoleerd en met een specifieke eiwit analyse (reverse phase protein

microarray) verder bekeken [15,16,17,18]. Om verschillen te kunnen ontdekken in de samenstelling van het stroma in beide groepen werd gezocht naar de aan- of afwezigheid van 58 specifieke eiwitten.

Statistische vergelijking toonde een verschil in de aanwezigheid van verschillende eiwitten (VEGFR-2, ZAP70, eNOS en ICAM-1). Deze stoffen kunnen als je gedetailleerd naar hun afzonderlijke werking kijkt bijdragen aan de betere prognose van patiënten met een stroma-lage tumor in vergelijking met stroma-hoog patiënten.

Verdere analyse liet hiernaast nog onderlinge verbindingen in de verschillende groepen zien (tussen eNOS en ARPC2 in de stroma laag groep). Deze bevindingen zouden een nieuwe aanzet kunnen geven voor aanvullend onderzoek om de verschillende tumortypes van deze twee prognostisch verschillende groepen beter te begrijpen op basis van hun stroma-hoeveelheid. En zo mogelijk hierop ook behandelopties te kunnen aanpassen.

TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

Het voornaamste doel is om de gevonden resultaten te implementeren in de dagelijkse klinische praktijk naast de reeds bestaande methoden. Om hoog risico patiënten te selecteren die aanvullende of aangepaste therapie nodig hebben of juist laag risico patiënten die misschien juist geen aanvullende therapie (meer) nodig hebben.

Om dit voor de TSR te bereiken is een grote internationale studie opgezet (de UNITED-studie) [19]. Als de resultaten van deze studie bekend zijn en opnieuw bevestigen dat het een waardevolle prognostische marker, dan voldoet de TSR aan alle voorwaarden om veilig in de dagelijkse praktijk toe te passen.

Naast het onderzoeken van tumor weefsel na een operatie zou het ook interessant kunnen zijn om de waarde van het tumor-stroma al voor de operatie op biopsieweefsel te evalueren. Bijvoorbeeld bij biopten verkregen bij een inwendig darmonderzoek (colonoscopie) dat nu onderdeel is van de huidige bevolkingscreening voor darmkanker. Een aantal onderzoeken beschrijven veelbelovende resultaten maar ook uitdagingen, bijvoorbeeld dat één biopt mogelijk niet de hele aard van de tumor goed weer kan geven. Meer onderzoek op dit gebied is nodig maar het kan veelbelovend zijn voor vroege voorspelling van de prognose of zelfs voorspelling en monitoring van therapeutisch voordeel bij patiënten met zowel een stroma-hoge als stroma-lage darm tumor.

Hiernaast is het digitaliseren van analyses ook een vernieuwing van de afgelopen jaren. Weefsel samples worden steeds vaker gescand en digitaal geanalyseerd in plaats van door de patholoog met een conventionele microscoop. Dit is een enorme stap voorwaarts, maar heeft nog veel uitdagingen. Kunstmatige intelligentie kan mogelijk in de toekomst een rol spelen bij analyse en klinische besluitvorming, maar met grote voorzichtigheid. Een geautomatiseerd systeem is meestal volledig data gedreven en niet getraind om te begrijpen waarom. Meer studies zijn nodig om de veiligheid van implementatie hiervan voor routinematig klinisch gebruik te verzekeren [20].

CONCLUSIE

In dit proefschrift beschrijven we een eiwitprofiel in bloed waarmee we darmkanker patiënten en gezonde personen kunnen onderscheiden. Mogelijk is dit een manier om darmkanker op een minder invasieve manier vroeg op te sporen. Als we een betere selectie kunnen maken welke patiënten een verhoogd risico hebben op darmkanker en daarvoor een colonoscopie (inwendig darmonderzoek) moeten ondergaan dan kunnen mogelijk een aantal onnodige colonoscopiën achterwege worden gelaten.

Daarnaast laten we zien dat de stroma marker (TSR) die wij in meerdere onderzoeken beschrijven een goed inzicht geeft over de prognose van een patiënt met darmkanker. Te verwachten is dat deze stroma marker na de bevestiging in de UNITED studie toegevoegd zal worden aan de standaard scoring van darmkanker patiënten. Hopelijk gaat deze stroma marker ons in de nabije toekomst dan ook helpen een betere risico inschatting te maken en daardoor ook betere onderbouwde patiënt gerichte keuzes te maken voor het geven van wel of geen aanvullende behandeling zoals chemotherapie na een operatie. Denk bijvoorbeeld aan het weglaten van chemotherapie voor een oudere kwetsbare patiënt met een stroma-laag profiel.

Tenslotte geven de onderzoeken in dit proefschrift meer inzicht in de omgeving van de tumorcellen. De belangrijke rol die deze cellen spelen in de interactie met de tumor cellen. Hierdoor hebben we nieuwe aanknopingspunten om te begrijpen waarom sommige darmtumoren agressiever zijn dan andere. Aanknopingspunten die kunnen leiden tot verder onderzoek naar nieuwe behandelmogelijkheden afgestemd op de specifieke tumor eigenschappen per patiënt. Met als doel een beter ziektebeloop en een betere overleving na te streven voor patiënten met darmkanker.

REFERENCE LIST

1. Bray, F., et al., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018. 68(6): p. 394-424.
2. Labianca, R., et al., Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 2013. 24 Suppl 6: p. vi64-72.
3. Bresalier, R.S., Early detection of and screening for colorectal neoplasia. *Gut Liver*, 2009. 3(2): p. 69-80.
4. Dotan, E. and S.J. Cohen, Challenges in the management of stage II colon cancer. *Semin Oncol*, 2011. 38(4): p. 511-20.
5. Califf, R.M. Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2018. 243(3):p213-221.
6. Ganepola GA, et al., Use of blood-based biomarkers for early diagnosis and surveillance of colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol*, 2014.6: p. 83-97.
7. Giatromanolaki, A., E. Sivridis, and M.I. Koukourakis, The pathology of tumor stromatogenesis. *Cancer Biol Ther*, 2007. 6(5): p. 639-45.
8. Mesker, W.E., et al., The carcinoma-stromal ratio of colon carcinoma is an independent factor for survival compared to lymph node status and tumor stage. *Cell Oncol*, 2007. 29(5): p. 387-98.
9. Mesker, W.E., et al., Presence of a high amount of stroma and downregulation of SMAD4 predict for worse survival for stage I-II colon cancer patients. *Cell Oncol*, 2009. 31(3): p. 169-78.
10. Midgley, R.S., et al., Phase III randomized trial assessing rofecoxib in the adjuvant setting of colorectal cancer: final results of the VICTOR trial. *J Clin Oncol*, 2010. 28(30): p. 4575-80.
11. Pendlebury, S., et al., A trial of adjuvant therapy in colorectal cancer: the VICTOR trial. *Clin Colorectal Cancer*, 2003. 3(1): p. 58-60.
12. Mathonnet, M., et al., Hallmarks in colorectal cancer: angiogenesis and cancer stem-like cells. *World J Gastroenterol*, 2014. 20(15): p. 4189-96.
13. Peiris-Pages, M., et al., Proteomic identification of prognostic tumour biomarkers, using chemotherapy-induced cancer-associated fibroblasts. *Aging (Albany NY)*, 2015. 7(10): p. 816-38.
14. Kerr, R.S., et al., Adjuvant capecitabine plus bevacizumab versus capecitabine alone in patients with colorectal cancer (QUASAR 2): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2016. 17(11): p. 1543-1557.
15. Silvestri, A., et al., Individualized therapy for metastatic colorectal cancer. *J Intern Med*, 2013. 274(1): p. 1-24.
16. Pierobon, M., et al., Application of molecular technologies for phosphoproteomic analysis of clinical samples. *Oncogene*, 2015. 34(7): p. 805-14.
17. Zupa, A., et al., A pilot characterization of human lung NSCLC by protein pathway activation mapping. *J Thorac Oncol*, 2012. 7(12): p. 1755-1766.
18. Jameson, G.S., et al., A pilot study utilizing multi-omic molecular profiling to find potential targets and select individualized treatments for patients with previously treated metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2014. 147(3): p. 579-88.
19. Smit, M., et al., Uniform Noting for International Application of the Tumor-Stroma Ratio as an Easy Diagnostic Tool: Protocol for a Multicenter Prospective Cohort Study. *JMIR Res Protoc*, 2019. 8(6): p. e13464.
20. Specogna AV, Sinicrope FA. Defining colon cancer biomarkers by using deep learning. *Lancet*. 2020 Feb 1;395(10221):314-316.

