

SAMENVATTING

Het adenocarcinoom van de distale slokdarm en maag-cardia is een agressieve ziekte met een slechte prognose voor patiënten. Tot nu toe is een operatieve behandeling nog steeds de beste curatieve optie, maar zelfs na een in opzet curatieve chirurgische resectie is de vijfjaarsoverleving slechts ongeveer 25%. Onderzoek naar nieuwe behandelingen om de overleving van deze patiënten te verbeteren was tot nu toe gericht op het verbeteren van chirurgische technieken en het ontwikkelen van (neo-) adjuvante chemo- en radiotherapie, maar de resultaten waren meestal teleurstellend. Om de behandelingsmogelijkheden te kunnen optimaliseren is inzicht in het ontstaan van slokdarmkanker onmisbaar.

De voornaamste risicofactor voor het ontwikkelen van een adenocarcinoom van de distale slokdarm of maag-cardia is langdurige reflux van maagzuur en duodenumsappen in de slokdarm (het zogenoemde 'zuurbranden'). Dit kan leiden tot een verandering van het normale plaveiselepitheel in metaplastisch cilinderepitheel, beter bekend als de 'Barrett-slokdarm'. Er zijn sterke aanwijzingen dat het adenocarcinoom ontstaat uit dit Barrett-epitheel door middel van een aantal genetische en histologische veranderingen die in de tijd plaatsvinden (de metaplasie-dysplasie-adenocarcinoom-sequentie). Meer inzicht en mogelijkheden tot detectie van de moleculaire veranderingen die ontstaan tijdens de maligne degeneratie van het Barrett-epitheel kunnen leiden tot het eerder detecteren van een kwaadaardig proces, wat resulteert in betere overlevingskansen. Ook kan deze kennis gebruikt worden voor de ontwikkeling van meer specifieke behandelingsstrategieën voor patiënten met slokdarmkanker.

De studies die beschreven worden in dit proefschrift hebben tot doel een beter inzicht te krijgen in de genetische aspecten van slokdarmtumoren en hun vermogen om uit te zaaien. Er is gekeken hoe deze afwijkingen invloed hebben op de overleving, en vervolgens wordt beschreven hoe deze kennis gebruikt kan worden om nieuwe behandelingstragediën te ontwikkelen voor patiënten met deze agressieve tumoren.

DEEL I

Hoofdstuk 1 beschrijft de genetische veranderingen die optreden tijdens het ontstaan van adenocarcinomen van de distale slokdarm uit pre-maligne Barrett-epitheel. Ondanks de enorme vlucht die de moleculaire biologie heeft genomen en die heeft geleid tot vele publicaties omtrent genetische

afwijkingen die een rol spelen bij het ontstaan van deze tumoren, blijft de exacte pathogenese voor het grootste deel onduidelijk. De genetische afwijkingen die wel duidelijk beschreven zijn, leveren bijna allemaal een bijdrage aan de maligne ontanding van een cel door hun effecten op de celcyclus-machine in de kern. Deze 'machine' is het mechanisme dat controleert of een cel gaat delen, differentiëren of sterft. Kennis over deze processen kan daarom gebruikt worden in het ontwikkelen van nieuwe therapeutische opties. Identificatie van vroege genetische veranderingen in het slokdarmepitheel kan bijdragen tot het eerder detecteren van een kwaadaardig proces. Het vroeg ontdekken van slokdarmtumoren leidt niet alleen tot een betere overleving van patiënten, maar biedt ook de mogelijkheid van endoscopische behandeling. Deze lokale behandeling zorgt voor een aanzienlijk lagere procedure-gerelateerde morbiditeit en mortaliteit in vergelijking met een chirurgische slokdarmresectie. Daarnaast wordt op basis van bepaalde genetische afwijkingen geprobeerd nieuwe selectieve farmacologische behandelingen te ontwikkelen. Ook kunnen gen-afwijkingen gebruikt worden voor het creëren van een gentherapeutische aanpak gericht op het corrigeren van genetische afwijkingen of het selectief aanvallen van tumorcellen.

DEEL II

In dit deel van het proefschrift wordt de waarde van verschillende diagnostische mogelijkheden geanalyseerd om een op maat gemaakte aanpak voor patiënten met slokdarmkanker te creëren. Voor patiënten met lymfkliermetastasen is een lokale endoscopische behandeling onvoldoende. Om te identificeren welke patiënten wél in aanmerking komen voor lokale behandeling, wordt in **Hoofdstuk 2** de nauwkeurigheid van de pre-operatieve detectie van lymfkliermetastasen door de echo-endoscopie (EUS) beschreven. Daarnaast worden de histopathologische karakteristieken van hooggradige dysplasie en vroege adenocarcinomen (onderverdeeld in zes stadia) gerelateerd aan de aanwezigheid van lymfkliermetastasen. De resultaten suggereerden dat de EUS-techniek betrouwbaar vroege afwijkingen zonder lymfkliermetastasen kan detecteren. Ook werd gezien dat m1-, m2-, m3- en sm1-laesies in aanmerking kunnen komen voor endoscopische behandeling als ze kleiner zijn dan 3 cm, een goede of matige differentiatiegraad hebben en er geen lymfangio-invasie is. Echter, voor de patiënt met een sm2- of sm3-laesie moet altijd een chirurgische resectie worden overwogen omdat het risico op uitzaaiingen in de lymfklieren erg hoog is voor deze tumoren. Een lokale behandeling zou daarom de kans op lange termijnoverleving verkleinen voor deze patiënten.

In **Hoofdstuk 3** wordt de klinische relevantie van immunohistochemisch gedetecteerde micrometastasen in lymfklieren uitgezocht voor het adenocarcinoom van de distale slokdarm en maag-cardia. Een micrometastase is een uitzaaiing van een enkel of klein groepje tumorcellen dat nog niet te detecteren is met conventioneel pathologische onderzoek. In dit onderzoek werd aangetoond dat deze micrometastasen een significante invloed hebben op de prognose van patiënten die geopereerd werden voor slokdarmkanker zonder histologisch gedetecteerde lymfkliermetastasen. Zelfs deze hele vroege uitzaaiingen waren geassocieerd met een hoge incidentie van locoregionale recidieven en het ontstaan van afstandsmetastasen. Bovendien bleek uit deze studie dat een uitgebreide (tweevelds) lymfklierdissectie het ontstaan van lokale recidieven niet volledig kan voorkomen. Daarom werd uit dit onderzoek geconcludeerd dat zelfs voor de curatie van slokdarmkankerpatiënten met deze vroege uitzaaiingen, systemische (neo-)adjuvante behandeling noodzakelijk is om langetermijnoverleving te bereiken.

DEEL III

Hoofdstuk 4 is een introductie over het enzym cyclooxygenase (COX) en de rol daarvan in de maligne onttaarding van het Barrett-epitheel. COX is een enzym dat o.a. zorgt voor de omzetting van arachidonzuur naar prostaglandines in de cel. Recent is ontdekt dat er twee vormen bestaan van dit enzym (COX-1 en COX-2). COX-1 komt in alle cellen tot expressie en kan beschouwd worden als een 'huishoud-enzym'. In tegenstelling tot COX-1 is COX-2 normaal gesproken niet aanwezig in weefsels, maar dit enzym kan opgereguleerd worden in onder meer ontstekingsprocessen en tijdens carcinogenese. In deze carcinogenese is COX-2 betrokken bij vele processen in de cel zoals het resistent worden voor apoptose-signalen, het verhogen van de celdeling, het stimuleren van de angiogenese en het moduleren van invasieve eigenschappen van de kankercel.

In **Hoofdstuk 5** is de COX-2 expressie bekeken in adenocarcinomen van de slokdarm ontwikkeld in een Barrett-segment. Vervolgens is deze expressie gecorreleerd aan klinische parameters, pathologische karakteristieken van de tumor, en de prognose van patiënten. Een hoge COX-2-expressie werd gezien in 79% van de tumoren. Patiënten met een hoge COX-2-expressie kregen vaker een lokaal recidief ($p=0.05$) en ontwikkelden significant vaker afstandsmetastasen ($p=0.02$). Ook de totale overleving van de patiëntengroep met een hoge COX-2-expressie was duidelijk afgenomen ($p=0.002$,

log rank test) ten opzichte van patiënten met een lage COX-2-expressie. Bovendien kon worden aangetoond dat COX-2-expressie een onafhankelijk prognostische variabele is voor overleving in een multivariate analyse ($p=0.002$). Deze resultaten ondersteunden het initiatief om een klinisch onderzoek op te zetten naar de waarde van selectieve COX-2-remmers als nieuwe (neo-) adjuvante chemotherapeutische behandeling voor Barrett-carcinomen.

Hierna werd de COX-2-expressie in adenocarcinomen van de distale slokdarm vergeleken met de COX-2-expressie in adenocarcinomen van de maag-cardia.

Hoofdstuk 6 laat zien dat de COX-2-expressie in cardiatumoren significant lager is dan in Barrett tumoren. Cardiatumoren hadden slechts een hoge COX-2 expressie in 41% van de patiënten ($p<0.0001$). De COX-2 expressie in cardia-carcinomen was niet gerelateerd aan klinische of pathologische parameters en er was geen relatie met overleving, zoals eerder beschreven voor de Barrett-carcinomen. Op basis van deze resultaten werd geconcludeerd dat deze twee tumoren een verschillende pathogenese en een andere genetische constitutie hebben, en daarom beschouwd moeten worden als twee afzonderlijke pathologische identiteiten.

Na het analyseren van de prognostische waarde van COX-2 in adenocarcinomen van de distale slokdarm en maag-cardia, werd in

Hoofdstuk 7 tenslotte ook de klinische relevantie van COX-2 expressie in plaveiselcelcarcinomen van de slokdarm geëvalueerd in patiënten behandeld met en zonder pre-operatieve chemotherapie. Van de patiënten die geen pre-operatieve chemotherapie hadden gekregen had 75% een hoge en 25% een lage COX-2-expressie in de tumor. In deze groep lieten de Kaplan-Meier curven geen associatie zien tussen COX-2-expressie en overleving.

Daarentegen was in de patiëntengroep die wel neo-adjuvant behandeld was met chemotherapie juist een lage COX-2-expressie (in 31% van de patiënten) significant gerelateerd aan het ontstaan van afstandsmetastasen ($p=0.03$) en een verminderde overleving ($p=0.02$). Deze resultaten suggereerden dat de prognostische significantie van COX-2 verschilt per tumortype en kan veranderen na behandeling, maar dat de waarde van selectieve COX-2-remmers in ieder geval minder veelbelovend lijkt te zijn voor het plaveiselcelcarcinoom dan voor het adenocarcinoom van de slokdarm. Echter, voor plaveiselcelcarcinomen zou COX-2-expressie gebruikt kunnen worden als een mogelijke marker voor een goede tumorrespons op neo-adjuvante chemotherapie.

De resultaten van voorgaande studies resulteerden in de start van een biochemische fase II-studie naar de waarde van selectieve COX-2-remming met celecoxib in patiënten met een adenocarcinoom van de distale slokdarm.

In deze studie wordt het effect van pre-operatieve behandeling met celecoxib op diverse tumormarkers geanalyseerd, en hoewel de studie nog steeds loopt worden de resultaten van de eerste 26 patiënten in **Hoofdstuk 8** gepresenteerd. Elf patiënten kregen celecoxib (400mg 2dd) als neo-adjuvante behandeling waarbij hun resultaten werden vergeleken met 15 patiënten uit de controlegroep. Daarbij werden ook de pre-operatieve bipten van de patiënten voor de celecoxib-behandeling vergeleken met weefsel uit het chirurgisch resectiepreparaat. Na een behandeling van gemiddeld 4 weken, werd een significante downregulatie van COX-2 en c-Met-expressie in de tumor gevonden. Hierbij was de celdeling in de tumor verminderd terwijl de hoeveelheid cellen in apoptose was gestegen. Uit deze resultaten werd geconcludeerd dat de rol van selectieve COX-2-remmers veelbelovend is. Echter, de langetermijnoverlevingsdata zullen moeten worden afgewacht voordat deze behandelingsstrategie kan worden geïmplementeerd in de dagelijkse behandeling van slokdarmkanker.

DEEL IV

Dit deel van het proefschrift gaat over studies naar de ontwikkeling van efficiënte en selectieve gentherapie voor slokdarmkanker. In **Hoofdstuk 9**, worden de algemene principes van gentherapie uitgelegd en wordt beschreven hoe deze algemene principes kunnen worden gebruikt in de behandeling van patiënten met slokdarmkanker.

Tot nu toe zijn de klinische resultaten van deze (als veelbelovende behandeling geïntroduceerde) techniek teleurstellend. Dit is voornamelijk te wijten aan twee belangrijke problemen: het gebrek aan een adequaat onderzoeksmodel om gentherapie-vectoren te analyseren, en de lage transductie-efficiëntie van adenovirale vectoren in tumorcellen. Om vectortransductie-efficiënties te kunnen onderzoeken in tumorcellen die vergelijkbaar zijn met de humane situatie, werd eerst een kweekstelsel opgezet met primaire humane cellen uit chirurgische resectiepreparaten, zoals beschreven in **Hoofdstuk 10**.

De slechte transductie van tumorcellen met de standaard gentherapie vectoren komt waarschijnlijk door een verminderde expressie van de Cocksacki en adenovirus receptor (CAR), die betrokken is bij de binding van het adenovirus aan de cel. Daarom is in hoofdstuk 10 ook onderzoek gedaan naar een nieuw getarget adenovirus met een tri-peptide (RGD) in de virus-knop. Deze RGD-vector kan de stap van binding aan CAR overslaan zodat het direct geïnternaliseerd kan worden in de tumorcel. Met dit RGD-virus werd een

stijging in de hoeveelheid virale expressie per tumorcel gezien, maar ook een stijging van het aantal getransduceerde cellen in slokdarmcarcinoom-cellijnen. Daarnaast werd ook een betere gentransfer gezien in de primaire celkweken van slokdarmcarcinoom cellen van humaan resectiemateriaal wanneer de getargete vector werd gebruikt. Daarom ligt in de lijn der verwachting dat deze nieuwe vector betere resultaten zal laten zien *in vivo*, in vergelijking met de niet-getargete virussen die tot nu toe in de kankergentherapie werden gebruikt. Hoewel primair gekweekte cellen van slokdarmresectiemateriaal beter vergelijkbaar zijn met de heterogene tumorcelpopulatie *in vivo*, mist dit systeem de complexe driedimensionale architectuur van tumoren *in vivo*. Daarom is vervolgens in **Hoofdstuk 11** een slokdarm 'explant model' opgezet waarbij slokdarmbiopten van patiënten werden gekweekt om een betrouwbaarder onderzoeksmodel voor slokdarmkanker te creëren. Viabiliteit van deze biopten bleek een limiterende factor voor dit onderzoeksmodel. Gekweekte biopten van normaal plaveiselepitheel, intestinale metaplasie en plaveiselcelcarcinomen bleken voldoende viabel om adenovirale transductie te analyseren, maar de viabiliteit van gekweekte adenocarcinoombiopten was slecht. Adenovirale transductie in het explant model bleek beperkt te zijn. Ook was het slechts gelokaliseerd in bepaalde cellen. Daarnaast liet het RGD-getargete virus in dit onderzoekssysteem geen verbeterde gentransfer zien.

Om nieuwe behandelingsstrategieën *in vivo* te kunnen onderzoeken, worden vervolgens in **Hoofdstuk 12** twee pogingen beschreven om een ratmodel voor Barrett-epitheel en adenocarcinomen te ontwikkelen. Het doel van dit onderzoek was om een diermodel te creëren waarbij de afwijkingen spontaan geïnduceerd worden door reflux van maagzuur en duodenumsappen. In het eerste experiment ondergingen 44 mannelijke Sprague-Dawley-ratten een end-to-side oesofagojejunostomie met resectie van de maag om duodeno-oesofageale reflux zonder maagzuur te bewerkstelligen. Helaas werd hierbij de conditie van de ratten zodanig aangetast dat het experiment voortijdig gestopt moest worden. In het tweede experiment werd een side-to-side oesofagojejunostomie gemaakt waarbij de maag *in situ* werd gelaten. Na 12 maanden werd een lang Barrett-segment gezien met de vorming van mucineuze tumoren op de plaats van de anastomose. Hoewel deze tumoren in eerste instantie leken op adenocarcinomen van de distale slokdarm, bleek bij nader onderzoek dat deze laesies waarschijnlijk niet reflux-geïnduceerd waren, maar waarschijnlijk berustten op reactieve afwijkingen op de hechtingen. De ware oorsprong van deze tumoren is echter tot op heden nog niet opgehelderd. De conclusie van dit onderzoek was dan ook dat dit ratmodel niet geschikt is om nieuwe behandelingsstrategieën voor Barrett-carcinomen te onderzoeken. Om de mogelijkheden van kankergentherapie voor slokdarmkanker verder te

optimaliseren is het noodzakelijk dat de vectoren tumorspecifiek zijn. In het laatste hoofdstuk, **Hoofdstuk 13**, is het gebruik van transcriptionele targeting met behulp van een tumorspecifieke promotor onderzocht. Omdat COX-2 regelmatig is opgereguleerd in gastrointestinale tumorcellen terwijl het niet te detecteren is in normale cellen, werd de selectiviteit van een COX-2-tumor-specifieke promotor geanalyseerd in adenovirale context. In deze studie werd aangetoond dat de activiteit van de vectoren onder controle van een COX-2-promotor direct was gecorreleerd aan de hoeveelheid COX-2-expressie in de cellijnen, wat de COX-2-specificiteit bewees. Helaas bleken de adenovirale vectoren zelf ook in staat om COX-2-expressie in de tumorcellijnen te induceren door middel van activatie van ontstekingsprocessen. Dit effect was bovendien ook aanwezig in normale primaire humane levercellen wat zeer belangrijk is gezien de natuurlijke voorkeur van de adenovirale vectoren voor levercellen. Daarom was de conclusie van dit onderzoek dat de ontstekingsgemedieerde activatie van de COX-2-promotor in adenovirale context, de tumorspecifieke eigenschappen van deze promotor compromitteert en dat deze COX-2-promotor daarom ongeschikt is om replicerende adenovirussen aan te zetten in de kankergentherapie.