

Genetisch en functioneel onderzoek naar het ontstaan van plaveiselcelcarcinomen in het hoofd-halsgebied

Auteur S.J. Smeets

Trefwoorden array comparative genomic hybridization, DNA-veranderingen, humaan papillomavirus, hoofd-halskanker

Samenvatting

Op 22 juni 2009 promoveerde dhr. ing. S.J. Smeets aan de Vrije Universiteit van Amsterdam op het proefschrift 'Genetic and functional analysis of head and neck carcinogenesis'. Hij deed dit onderzoek onder begeleiding van de promotoren dhr. prof. dr. R.H. Brakenhoff en dhr. prof. dr. C.R. Leemans, afdeling Keel-, Neus- en Oorheelkunde/Hoofd-Halschirurgie en copromotoren dhr. dr. B.J.M. Braakhuis, afdeling Keel-, Neus- en Oorheelkunde/Hoofd-Halschirurgie en dhr. dr. B. Ylstra, afdeling Pathologie, allen in dienst van het VU medisch centrum. Het roken van tabak en overmatig alcoholgebruik worden als de belangrijkste oorzaken van plaveiselcelcarcinomen in het hoofd-halsgebied (HHPCC)

beschouwd, maar in 10 tot 20% van de gevallen blijkt het zogenoemde humaan papillomavirus (HPV) een oorzakelijke rol te spelen. Het doel van het onderzoek was om beter moleculair inzicht te krijgen in zowel de tabak- en alcohol-, als de HPV-gerelateerde carcinogenese van HHPCC. Hiervoor werd een techniek opgezet waarmee met een hoge resolutie genoomwijd DNA-afwijkingen in carcinomen kunnen worden bestudeerd. Deze nieuwe methode werd toegepast op HPV-positieve en -negatieve HHPCC. De bevindingen werden vervolgens gerelateerd aan het klinische beloop van de ziekte en moleculair getoetst in een celkweekmodelsysteem dat ontworpen werd voor HHPCC.

(Ned Tijdschr Oncol 2010;7:42-4)

Inleiding

De laatste 20 jaar is er veel vooruitgang geboekt in de behandeling van plaveiselcelcarcinomen in het hoofd-halsgebied (HHPCC). Toch is de kans op overleving op de lange termijn slechts beperkt verbeterd. Het lijkt erop dat verdere vooruitgang alleen kan worden geboekt als de onderliggende pathobiologie van deze carcinomen wordt opgehelderd. Hiervoor moeten de verantwoordelijke kankergenen en de bijhorende signaalpaden worden geïdentificeerd, en hun rol in de behandeling en het ontstaan van terugkerende ziekte worden onderzocht. Een belangrijk recent verworven inzicht is dat de etiologie van hoofd-halskanker iets ingewikkelder ligt dan voorheen werd gedacht. De belangrijkste en klassieke risico-factoren voor het ontwikkelen van HHPCC zijn het roken van tabak en overmatig gebruik van alcohol. Recent is beschreven dat ook het humaan papillomavirus (HPV) HHPCC kan veroorzaken.

Nauwkeurige HPV-detectie voor hoofd-halscarcinomen

Het is moeilijk om op grond van alle gepubliceerde gegevens een duidelijk beeld te krijgen van het exacte percentage van carcinomen waarbij HPV een rol speelt. Het virus kan niet eenvoudig gekweekt worden, maar de aanwezigheid van het virus kan worden vastgesteld met DNA-testen. De verschillende testen die zijn ontwikkeld hebben een verschillende detectiegrens en zijn soms erg gevoelig, waardoor een grote kans bestaat dat de resultaten fout-positief zijn. Tevens hangen de resultaten af van het type klinisch materiaal dat wordt getest. Daarom zijn in dit onderzoek als eerste de meest gebruikte HPV-detectiemethoden met elkaar vergeleken met als doel de meest gevoelige en specifieke HPV-bepaling te verkrijgen.¹ Deze moest ook toepasbaar zijn op standaard formaline-gefixeerd paraffine-ingebede weefselmateriaal, omdat dit in alle pathologie-archieven ligt

opgeslagen. Een test met een 100% specificiteit en gevoeligheid werd bereikt door een combinatie van 2 standaard diagnostische technieken; alle HHPCC's moeten dan eerst getest worden op overexpressie van het p16-eiwit, gevolgd door een GP5+/6+HPV-DNA-PCR op de p16-positieve carcinomen.¹

Ontwikkeling van 'array comparative genomic hybridization' voor genetische karakterisering van hoofd-halscarcinomen

Kanker ontstaat door een accumulatie van genetische veranderingen in het DNA van een cel. De genetische veranderingen beïnvloeden de activiteit van genen die betrokken zijn bij onder andere celgroei, invasie, uitzaaiing en celdood. Het onderzoek richtte zich op het identificeren van de genetische veranderingen in HHPCC in relatie tot klinische en moleculaire variabelen. Voor dit doel werd array-gebaseerde vergelijkende genomhybridisatie ('comparative genomic hybridization'; CGH) met een genomische resolutie van ~1 megabase (Mb) opgezet. Met array-CGH is het mogelijk om op een efficiënte wijze alle genetische veranderingen over het gehele genoom van een carcinoom in kaart te brengen.

HPV-positieve en -negatieve hoofd-halscarcinomen zijn genetisch verschillend

Deze array-CGH-methode is vervolgens toegepast op een groep HHPCC's die wel of geen HPV bevatten.² HPV-negatieve carcinomen bleken zeer specifieke chromosomale veranderingen te hebben, zoals het verlies van 9p21, amplificatie van 11q13.1 en de aanwezigheid van p53-mutaties. Deze DNA-veranderingen zijn geassocieerd met een blokkering van de p53- en pRb-signaalpaden, die betrokken zijn bij de regulatie van onder andere de celcyclus en geprogrammeerde celdood (apoptose). Het interessante hiervan is dat ook het virus 2 oncogenen bezit die precies deze 2 signaalpaden uitschakelen. Hieruit blijkt dat HHPCC zich ontwikkelt langs 2 verschillende routes; één gedreven door de blootstelling aan kanker- verwekkende stoffen (zoals tabak en alcohol) zonder HPV, en één gedreven door infectie met HPV. Dezelfde signaalpaden worden echter geïnactiveerd.²

Onder HPV-negatieve hoofd-halscarcinomen bestaan meerdere subgroepen

Vervolgens is de hypothese onderzocht of er misschien nog extra subgroepen binnen de HPV-negatieve

carcinomen kunnen worden onderscheiden op basis van het patroon van chromosomale afwijkingen.³ Met behulp van een recent beschreven classificatie-algoritme konden 3 groepen HPV-negatieve carcinomen onderscheiden worden: (I) één gekarakteriseerd door zeer weinig DNA-veranderingen, (II) een ander door een relatief grote hoeveelheid DNA-veranderingen en (III) een derde met een zeer grote hoeveelheid DNA-veranderingen.³ De patiënten met carcinomen met zeer weinig chromosomale veranderingen hadden een significant betere overleving. Ook konden we geen aanwijzingen vinden dat de p53- en pRb-signaalpaden waren aangedaan, suggererend dat het om een totaal andere tumorgroep gaat.³ Kortom, een zeer interessant en verrassend inzicht dat verder moet worden uitgewerkt.

Gevonden genetische verschillen functioneel onderzocht met een modelsysteem voor hoofd-halskanker

Zoals boven reeds beschreven bleek dat in de HPV-positieve en de meeste HPV-negatieve carcinomen zowel het p53- als het pRb-signaalpad geblokkeerd wordt.^{2,4} De vraag was of dit eenzelfde effect heeft op de cel, een vraag die alleen in een experimenteel model getoetst kan worden. Op dit moment zijn er geen geschikte transgene muismodellen beschikbaar voor HHPCC om kandidaat-kankergenen te onderzoeken. Om die reden hebben wij een celkweekmodel van conditioneel onsterfelijke primaire orale plaveiselcellen ontwikkeld waarin allerlei genetische modificaties aangebracht kunnen worden.⁵ Blokkade van het p53-signaalpad bleek altijd tot een langere levensduur van de cellen te leiden, of dit nu veroorzaakt werd door het HPV-oncogen E6 te gebruiken of de genetische veranderingen in het gen zelf na te bootsen. Blokkade van het pRb-signaalpad door vermindering van p16-expressie, vermeerdering van cycline D1 of expressie van het HPV-oncogen E7 bleken geen effect te hebben op de levensduur van de cellen. In combinatie met ongeacht welke blokkade van het p53-pad leidde dit echter tot immortalisatie: de cellen werden onsterfelijk, een van de belangrijkste kenmerken van kankercellen. Onze resultaten suggereren eveneens dat de volgorde van genetische veranderingen in de HHPCC-carcinogenese kritisch is, met blokkade van de pRb- en p53-signaalpaden als essentiële en waarschijnlijk eerste veranderingen. Dit celkweekmodel van conditioneel geïmmortaliseerde primaire orale plaveiselcellen vereenvoudigt de functionele analyse van andere kandidaat-kanker-

Aanwijzingen voor de praktijk

1. Recentelijk is beschreven dat naast het roken van tabak en overmatig gebruik van alcohol, ook het humaan papillomavirus (HPV) plaveiselcelcarcinomen in het hoofd-halsgebied kan veroorzaken.
2. Een betrouwbare methode om HPV aan te tonen op zowel vries als formaline-gefixeerd paraffine-ingebed weefselmateriaal is door eerst overexpressie van het p16-eiwit te bepalen met een immunohistochemische kleuring, gevolgd door een GP5+/6+HPV-DNA-PCR op de p16-positieve carcinomen.
3. Met inachtneming van de groep van HPV-positieve plaveiselcelcarcinomen, bestaan er minstens 3 genetisch verschillende subgroepen met waarschijnlijk hun eigen specifieke route naar kanker.

genen en maakt ook het uitvoeren van grootschalige functionele genetische screens mogelijk.⁵

Klinische relevantie

De ontdekking van deze nieuwe indeling van HHPCC met unieke genetische en klinische kenmerken kan belangrijke gevolgen hebben voor toekomstige biologische en klinische studies. De belangrijkste conclusie is, met inachtneming van de groep van HPV-positieve HHPCC, dat minstens 3 genetisch verschillende subgroepen van HHPCC bestaan met waarschijnlijk hun eigen specifieke route naar kanker.²⁻⁴ Het is nog te vroeg om te speculeren over het precieze belang van deze classificatie voor het klinisch handelen. Er is in ieder geval consensus over het feit dat HPV-positieve HHPCC als verschillend moeten worden beschouwd en voor deze specifieke groep is in de literatuur de discussie over een specifieke behandeling in volle gang. Er is helaas nog geen consensus over de meest betrouwbare HPV-detectiemethode, maar het ontwikkelde detectie-algoritme zou hiervoor de ideale oplossing zijn: eenvoudig, betrouwbaar en toepasbaar op paraffine-ingebed archiefmateriaal.¹ Pas met een dergelijke betrouwbare test kan de juiste prevalentie en de veronderstelde gunstigere prognose van patiënten met HPV-positieve carcinomen met zekerheid bepaald worden in grote series.

Referenties

1. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, Haesevoets A, Snijders PJ, Pawlita M, et al. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer* 2007;121:2465-72.

2. Smeets SJ, Braakhuis BJ, Abbas S, Snijders PJ, Ylstra B, Van de Wiel MA, et al. Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. *Oncogene* 2006;25:2558-64.
3. Smeets SJ, Brakenhoff RH, Ylstra B, Van Wieringen WN, Van de Wiel MA, Leemans CR, et al. Genetic classification of oral and oropharyngeal carcinomas identifies subgroups with a different prognosis. *Cell Oncol* 2009;31:291-300.
4. Wilting SM, Smeets SJ, Snijders PJ, Van Wieringen WN, Van de Wiel MA, Meijer GA, et al. Genomic profiling identifies common HPV-associated chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of cervix and head and neck. *BMC Med Genomics* 2009;2:32.
5. Smeets SJ, Schaaij-Visser TB, Van Veen EA, Van Meerloo J, Braakhuis BJ, Steenbergen RD, et al. Immortalization of normal oral keratinocytes by the human papilloma virus 16 genes E6 and E7. *Aangeboden voor publicatie* 2009.

Ontvangen 24 augustus 2009, geaccepteerd 29 september 2009.

Correspondentieadres

Dhr. dr. S.J. Smeets, wetenschappelijk onderzoeker

VU medisch centrum
Afdeling Keel-Neus- en Oorheelkunde/
Hoofd-Halschirurgie
Postbus 7057
1007 MB Amsterdam
Tel.: 020 444 24 12
E-mailadres: s.smeets@vumc.nl

Belangenconflict: geen gemeld.
Financiële ondersteuning: geen gemeld.