

Early detection of breast cancer by organ-specific and circulatory liquid biopsies



Susana Patuleia

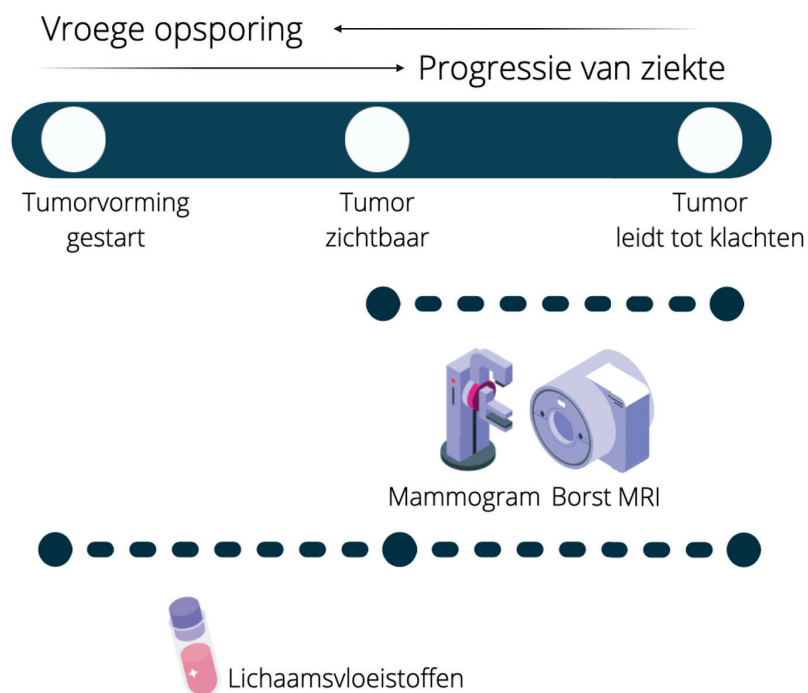
Vroege opsporing van borstkanker

Borstkanker is de meest voorkomende vorm van kanker bij vrouwen, zowel wereldwijd als in Nederland. In 2019 hebben in Nederland in totaal 17.114 vrouwen de diagnose primair ductaal carcinoma *in situ* (DCIS, wat wordt beschouwd als een voorstadium van borstkanker) of invasieve borstkanker gekregen. Borstkanker komt ook bij mannen voor en werd in Nederland in 2019 bij 139 mannen vastgesteld. De behandeling van deze ziekte betreft in de meeste gevallen een operatie al dan niet gecombineerd met radiotherapie, en, afhankelijk het type borsttumor, anti-hormonale therapie, chemotherapie en/of immunotherapie. Om de intensiteit van deze behandelingen en de nadelige gevolgen daarvan te beperken wordt er al jaren geïnvesteerd in vroege opsporing van borstkanker. Zo werd in 1989 in Nederland het 2-jaarlijkse landelijke bevolkingsonderzoek borstkanker geïmplementeerd, gebruik makend van een mammografie. Een aantal jaar later werd een jaarlijkse screening met mammografie of borst-MRI gestart voor vrouwen met een verhoogd risico op borstkanker, zoals voor hen die draagster zijn van een erfelijke afwijking in de *BRCA1* of *BRCA2* genen. Het feit dat vroege opsporing nu afhankelijk is van medische beeldvorming (mammografie of borst-MRI) maakt dat een borsttumor pas vastgesteld kan worden als het een omvang heeft die zichtbaar is bij beeldvorming. Het is bekend dat de prognose van de patiënt met borstkanker verbetert als de tumor kleiner is; in dat licht zou het nog beter zijn als de ontwikkeling van kanker ontdekt zou kunnen worden nog voordat deze zich tot een zichtbare tumor heeft ontwikkeld. De laatste jaren richt het onderzoek naar de vroege opsporing van kanker zich vooral op de rol van zogenaamde biomarkers, 'signaalstoffen' die, wanneer zij in het lichaam gevonden worden, o.a. kunnen duiden op een vroege ontwikkeling van kanker. Voorbeelden van biomarkers zijn cel-vrij DNA, eiwitten en microRNA's. Het aantonen van deze biomarkers kan dan een teken zijn dat een behandeling nodig is om de verdere groei tot een zichtbare tumor tegen te houden. Daarmee zou het mogelijk worden om de ziektelast van (ook borst-)kanker te minimaliseren of zelfs te voorkomen.

Biomarkers in lichaamsvloeistoffen voor vroege opsporing van borstkanker

Met dit in gedachte hebben we in ons onderzoek onze focus gericht op het analyseren van biomarkers in tepelvocht (NAF, in het Engels 'nipple aspirate fluid') en in bloed. Samples van NAF en bloed hebben we afgenomen bij drie verschillende groepen vrouwen: 1) gezonde vrijwilligers (controlegroep), 2) vrouwen met de diagnose invasieve borstkanker, en 3) vrouwen met een hoog risico op het ontwikkelen van borstkanker, zoals de *BRCA1/2*-genmutatiedraagsters.

In het onderzoek hebben we in eerste instantie de samples van de groep gezonde vrijwilligers vergeleken met die van de groep vrouwen met de diagnose invasieve borstkanker. Door de resultaten zoals gevonden in de samples van vrouwen met bewezen borstkanker te vergelijken met de uitkomsten van de samples die bij gezonde vrouwen zijn afgenomen, kun je vaststellen welke biomarkers meer of minder aanwezig zijn als zich borstkanker in het lichaam ontwikkeld heeft. Dit geeft dus de mogelijkheid om een panel van biomarkers specifiek voor borstkanker samen te stellen. Dit biomarker-panel wordt vervolgens ingezet bij vrouwen uit het derde cohort. Bij vrouwen die deelnamen in dit cohort zijn gedurende een periode van maximaal 10 jaar, jaarlijks NAF en bloed afgenomen. Bij een aantal van deze vrouwen is in de loop van die 10 jaar helaas borstkanker ontstaan. Bij deze vrouwen worden de samples, die jaren voorafgaand aan de diagnose borstkanker afgenomen zijn, onderzocht op de aanwezigheid van het biomarker-panel. Op deze manier kan onderzocht worden of deze biomarkers ook de ontwikkeling van borstkanker kunnen aantonen, jaren *voordat* het tot een tumor van een zichtbare afmeting heeft geleid (Figuur 1).



Figuur 1. Schematische weergave van het uiteindelijke doel van het onderzoek: een samenstelling van biomarkers identificeren in lichaamsvloeistoffen die toegepast kunnen worden voor vroege opsporing van borstkanker. Hierdoor zou opsporing mogelijk zijn, bijvoorbeeld, nog vóór dat een borsttumor middels medische beeldvorming zichtbaar is.

Bevindingen beschreven in dit proefschrift

Om de vraag te beantwoorden of NAF een toegevoegde waarde heeft in de vroege opsporing van borstkanker hebben wij gekozen voor een meervoudig cohort-biobank onderzoek zoals eerder beschreven. De aspecten die voor een goede uitvoering van een dergelijk onderzoek noodzakelijk zijn, worden in dit proefschrift beschreven.

In deel I geven we een inleiding over wat tepelvocht (NAF) is, hoe het verkregen wordt en waarop gelet moet worden als NAF gebruikt wordt voor biomarker analyse. Tevens worden in dit deel de praktische aspecten bij het uitvoeren van een dergelijk langlopend cohortonderzoek beschreven en wordt aangegeven hoe de deelnemende vrouwen de tepelvochtafname (NFA, in het Engels 'nipple fluid aspiration') hebben ervaren. In deel II van dit proefschrift beschrijven we analyses van de door ons onderzochte biomarkers, microRNA's, in NAF en bloedsamples.

Deel 1

Hoofdstuk 2: Inleiding over tepelvocht, NAF

In hoofdstuk 2 geven we een inleiding over NAF. NAF is een lichaamsvloeistof die zich bevindt in de kanalen (melkgangen) van de borst die uitmonden in de tepel. Borstkanker ontstaat in deze melkgangen en daardoor is NAF mogelijk een waardevolle vloeistof om te onderzoeken op biomarkers voor borstkanker. NAF kan via de tepel gemakkelijk, veilig en regelmatig worden verkregen door gebruik te maken van de neusspray oxytocine en een aangepast kolfstelsel. Bij gebruik van NAF dient met een aantal aspecten rekening gehouden te worden, zoals de kleine volumes, de viscositeit van NAF en de verschillende kleuren. Mondiaal hebben meerdere onderzoeksgroepen zich beziggehouden met het onderzoeken van NAF samples. Wij zijn de eerste die hebben gewezen op de impact van de kleuren van NAF op biomarker analyses (zoals later in hoofdstuk 6 beschreven). Tot slot beschrijven wij de theoretische (diagnostische) toepasbaarheid van biomarkers in NAF (of bloed) binnen de zorgketen.

Hoofdstuk 3: Ervaringen van onderzoekers over het uitvoeren van het onderzoek

Bij het uitvoeren van een lang lopend cohortonderzoek zoals dit, waaraan vrouwen met een verhoogd risico op borstkanker gedurende maximaal 10 jaar jaarlijks hebben deelgenomen, worden diverse ervaringen opgedaan. Deze ervaringen hebben wij in dit hoofdstuk door middel van een aantal aanbevelingen beschreven. Deze aanbevelingen omvatten een scala aan praktische aspecten, variërend van het opzetten van het onderzoeksteam,

uitdagingen bij het verkrijgen van financiering, het belang van communicatie met teamleden en proefpersonen, alsmede initiële aspecten waarmee rekening moet worden gehouden in het laboratorium. De beschreven ervaringen zijn niet alleen gedeeld door ons, maar ook door de onderzoeksgroep van de zogenaamde TESTBREAST studie (trialregister nummer NL8724), oftewel, door twee onafhankelijke onderzoeksgroepen die een vergelijkbare onderzoeksopzet hebben, namelijk lange termijn studies met cohorten van vrouwen met een verhoogd risico op borstkanker.

Hoofdstuk 4: Ervaringen van de deelnemende vrouwen over de tepelvochtafname

Terwijl in hoofdstuk 3 het perspectief van de onderzoekers op het uitvoeren van het onderzoek wordt weergegeven, beschrijft hoofdstuk 4 hoe de deelnemende vrouwen uit alle drie de cohorten de NFA hebben ervaren. Onze gegevens toonden aan dat vrouwen duidelijk minder ongemak ervoeren tijdens de NFA (ongemak score van 1 op een schaal van 0-10) in vergelijking met de mammografie en borst-MRI (ongemak score van respectievelijk 5 en 3). Deze gegevens bevestigen eerder gepubliceerde resultaten over ongemaksscores bij NFA bij gezonde vrouwen en vrouwen met een verhoogd risico op borstkanker. De bloedafname werd als het minst belastend ervaren. Dit was een te verwachte uitkomst, aangezien een bloedafname een snel en algeheel geaccepteerde procedure is. Het is echter voor het eerst op deze manier vergeleken en vastgelegd. Voorts blijkt uit onze vragenlijsten dat vrijwel geen van de vrouwen bezwaar zou hebben tegen een tepelvochtafname in het kader van toekomstige wetenschappelijke studies dan wel in de klinische praktijk voor opsporing van borstkanker.



Deel 2

Hoofdstuk 5: Het normale patroon van de biomarkers “microRNA’s” in NAF, borstweefsel, borstmelk, plasma en serum

MicroRNA's zijn een van de vele soorten biomarkers. MicroRNA's zijn stoffen die invloed kunnen hebben op de aanmaak van eiwitten. Door de aanmaak van bepaalde eiwitten te verstoren, kunnen tumoren zich gaan ontwikkelen – daarom dat microRNA's een belangrijke rol spelen in tumorvorming. Op dit moment zijn er meer dan 2000 microRNA's bekend. Aangezien microRNA's geassocieerd worden met het ontstaan van kanker, zijn wij deze gaan onderzoeken in NAF. In dit kader hebben wij in dit hoofdstuk voor het eerst vastgelegd dat het mogelijk is om microRNA's te detecteren in NAF. Wij hebben beschreven welke microRNA's aanwezig zijn in NAF samples van gezonde vrouwen. Het viel ons op dat in de onderzoeken die gepubliceerd waren de meest voorkomende microRNA's in gezonde samples vaak niet worden gerapporteerd. Daarom hebben wij deze

lijsten samengesteld voor NAF, borstweefsel, borstmelk, plasma en serum. Onze veronderstelling was dat de microRNA's in NAF het meest zouden overlappen met de lijst microRNA's in borstmelk en borstweefsel, omdat dit immers borst-specifieke samples zijn. Verrassend genoeg blijken de meest voorkomende microRNA's in NAF niet een betere afspiegeling van de borst dan bloedsamples. Wel komt naar voren dat de meeste microRNA's in NAF een belangrijke rol kunnen spelen in de biologische processen die leiden tot tumorvorming in de borst.

Hoofdstuk 6: De invloed van verschillende kleuren tepelvocht op het normale microRNA patroon

NAF samples hebben verschillende kleuren en helderheid. In dit hoofdstuk hebben wij onderzocht of de verschillende kleuren en helderheid van de NAF samples invloed zouden hebben op het microRNA patroon. Hoewel dit voor de hand zou liggen, zijn deze kenmerken niet eerder meegenomen in (andere) biomarker analyses van NAF samples. Uit het onderzoek beschreven in dit hoofdstuk, blijkt dat er wel degelijk een verband bestaat tussen het uiterlijke kenmerk van NAF samples en de hoeveelheid microRNA's. Het doel van deze rapportage is om bewustzijn te creëren bij andere onderzoekers die gebruik maken van NAF of van andere samples, zoals sputum en urine, die ook verschillende uiterlijke kenmerken kunnen hebben.

Conclusie

Met ons onderzoek streven we ernaar om biomarkers voor vroege opsporing van borstkanker te identificeren in NAF en bloed. Het tot stand brengen van dit idee in een onderzoeksproject vereist, naast een lange adem, een goed ontworpen protocol met verschillende cohorten. Vrouwen die aan het onderzoek hebben deelgenomen waren positief over de beperkte belasting van het afnemen van NAF en bloed. Beide werden als minder belastend ervaren dan de huidige medische beeldvorming (mammogram en borst-MRI). Het meten van onze doelbiomarkers, microRNA's, in NAF is uit ons onderzoek voor het eerst haalbaar gebleken. Daarnaast hebben wij met ons onderzoek laten zien dat kleur en helderheid van de NAF samples invloed hebben op de microRNA meting. Het werk dat beschreven wordt in dit proefschrift legt een basis voor toekomstige projecten. Deze projecten zullen zich richten op microRNA's in de context van hoge borstdichtheid en microRNA's voor vroege opsporing van borstkanker in lichaamsvloeistoffen. Tevens gaan wij drie verschillende technieken vergelijken om te onderzoeken welke het best toegepast kan worden voor de analyse van microRNA's in NAF samples. De eerste resultaten van deze projecten worden eind 2022 verwacht.



