

A molecular epidemiological study on colorectal cancer: meat, fat, smoking and genetic alterations

Citation for published version (APA):

Luchtenborg, M. (2005). *A molecular epidemiological study on colorectal cancer: meat, fat, smoking and genetic alterations*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20050701ml>

Document status and date:

Published: 01/01/2005

DOI:

[10.26481/dis.20050701ml](https://doi.org/10.26481/dis.20050701ml)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY



142

Colorectal cancer affects a large number of people worldwide, in particular in Western countries. Like other cancers, cancer of the colon and rectum is a multi-factorial disease. Besides increasing age and a positive family history of colorectal cancer, dietary and lifestyle factors are likely candidates for affecting colorectal cancer risk. A high intake of fat, meat and alcohol as well as cigarette smoking are thought to increase the risk of developing a colorectal tumour, whereas vegetable, fibre and possibly fruit consumption may decrease the risk. However, observed associations are often weak and sometimes inconsistent.

The majority of colorectal carcinomas seem to arise through a series of well-defined histopathological changes, referred to as the adenoma-carcinoma sequence. A generally accepted paradigm for the mechanism underlying colorectal cancer development describes the sequential accumulation of genetic alterations in the adenomatous polyposis coli (APC), Kirsten ras (K-ras), and tumour protein 53 (TP53) genes. In addition to mutations in specific genes, most colorectal tumours display either chromosomal or microsatellite instability. In the majority of colorectal cancers chromosomal instability is observed. A smaller fraction (10 to 15%) is marked by microsatellite instability, which in approximately 90% of sporadic colorectal tumours is related to defective human Mut-L homologue 1 (hMLH1) function. These two types of genetic instability seem to represent distinct pathways, and possibly reflect differences in aetiology. Environmental factors may exert a direct effect on carcinogenesis through induction of DNA damage that results in mutations in genes relevant to tumour formation or may drive the selection of tumours harbouring specific mutations. Different molecular pathways in colorectal cancer may therefore reflect exposure to various environmental factors. The aims of the studies described in this thesis were to investigate the occurrence of genetic alterations thought to be important to the early stages of colorectal cancer development and to gain insight in the relation between environmental exposures and colorectal cancer as well as these genetic alterations.

The studies described in this thesis were carried out within the framework of the Netherlands Cohort Study on diet and cancer (NLCS) that was initiated in September 1986. At baseline, 120,852 men and women between 55 and 69 years of age, completed a 150-item food frequency and lifestyle questionnaire. A subcohort of 3,500 male and female subjects was randomly drawn from the cohort and followed-up biennially to determine accumulated person years. Through record linkage of the cohort with the Netherlands Cancer Registry and PALGA, 929 cases of colorectal cancer were identified after 7.3 years of follow-up of the cohort and excluding the first 2.3 years. From 54 pathology laboratories throughout the Netherlands, formalin-fixed, paraffin-embedded tumour material of 737 patients could be obtained, which was used for subsequent analyses of molecular alterations present in their tumours.

In the study described in **chapter 2**, the occurrence and type of mutations in the APC gene were studied in 665 patients for whom the mutation cluster region of the APC gene could be analysed completely. We observed a large number of mutations in total, which was in part due to the occurrence of multiple mutations in 40% of tumours. However, despite 72% of the carcinomas harbouring one or more mutations, only 37% of patients had a carcinoma with

at least one mutation that would result in a truncated and therefore inactivated APC protein, whereas 29% of patients harboured at least one missense mutation, but no truncating mutation and 6% of patients had a silent mutation, but no truncating or missense mutation. Rectosigmoid and rectal tumours relatively more frequently harboured C→T point mutations or frameshift mutations that would result in a truncated APC protein when compared to proximal and distal colon tumours, suggesting different aetiology of colon and rectal cancer.

Chapter 3 presents the results from our study on the occurrence of mutations in the APC, CTNNB1, K-ras genes and expression of hMLH1 in 656 carcinomas for which the analysis of these molecular features could be completed, and in which the characteristics of the patients and tumours were compared based on these genetic aberrations. Mutations at the phosphorylation sites of the CTNNB1 gene encoding β-catenin were a rare occurrence (5/464). Striking differences between hMLH1 deficient tumours and tumours harbouring a truncating APC and/or activating K-ras gene mutation were observed. Patients with a hMLH1 deficient tumour were older, more often women, their tumours were more often located in the proximal colon and showed poorer differentiation when compared to patients harbouring tumours with an APC and/or K-ras mutation.

Meat has been proposed as a risk factor for colorectal cancer based on its animal fat and haem iron content as well as its preparation. Due to varying means of preparation, different types of meat may contain heterocyclic aromatic amines, polycyclic aromatic hydrocarbons, and N-nitrosamines that may cause specific DNA damage. Thus, constituents of meat may influence the risk of developing tumours harbouring different genetic alterations, i.e. mutations in the APC gene or mismatch repair deficiency. The study on the associations between meat and fish consumption and genetic alterations in colon and rectal tumours, described in **chapter 4**, showed no association between total fresh meat, poultry or fish consumption and risk of colon or rectal cancer overall, nor tumours with or without specific genetic alterations. Meat product (processed meat) consumption, however, showed a positive association with colon tumours harbouring a truncating APC mutation (incidence risk ratio (RR) 1.61, 95% confidence interval (CI) 0.96-2.71 for highest versus lowest quartile of intake), whereas beef consumption was associated with an increased risk of colon tumours without a truncating APC mutation (RR 1.58, 95% CI 1.10-2.25 for highest versus lowest quartile of intake). None of the meat and fish variables were found to be associated with lack of hMLH1 expression, which led us to conclude that several types of meat may contribute differently to the aetiology of colon and rectal cancer, depending on APC mutation status, but not its hMLH1 expression status.

Dietary fats may both constitute a risk for developing colorectal cancer or exert a protective effect, depending on the type of fat. In **chapter 5**, the study on the relation between various dietary fats and molecular aspects of colorectal cancer as determined by the APC and K-ras mutation status and hMLH1 expression status is described. No clear associations were observed for intake of total, saturated and mono-unsaturated fat and risk of colon and rectal cancer or the different molecular subgroups. Linoleic acid, the main constituent of

polyunsaturated fatty acid intake, was associated with an increased risk of colon cancer with only a *K-ras* mutation and no additional truncating APC mutation or lack of hMLH1 expression (RR 6.74, 95% CI 2.36-19.51 for highest versus lowest quartile of intake). Linoleic acid intake was neither associated with risk of colon tumours without any of the gene defects, with tumours only lacking hMLH1 expressing, nor with tumours only harbouring APC mutations. Our data suggest a unique aetiology of tumours that harbour specific genetic aberrations.

Cigarette smoke contains numerous carcinogens that through direct or systemic contact with the colorectal epithelium may contribute to an increased risk of developing colorectal cancer. The aim of the study described in **chapter 6** was to study the contribution of cigarette smoking to sporadic colorectal cancer according to molecular alterations of the tumours and according to genetic susceptibility as determined by the glutathione S-transferase (*GST*) *GSTM1* and *GSTT1* genotypes. In comparison to never-smokers, a high smoking frequency was associated with an increased risk of colorectal cancer (RR 1.07, 95% CI 1.03-1.12 per five cigarettes/day increment) and this association was stronger in tumours without a truncating APC mutation (RR 1.11, 95% CI 1.05,1.17). Long-term smoking was associated with tumours lacking hMLH1 expression (RR 1.17, 95% CI 1.00-1.37 per 10 years increment). No statistically significant interactions between smoking and *GSTM1* or *GSTT1* genotype were observed. We concluded that cigarette smoking is associated with risk of colorectal cancer, and that this association may depend on molecular characteristics of the tumour as defined by APC mutation and hMLH1 expression status.

In **chapter 7** the main findings from the studies described in this thesis are summarised and discussed in the light of methodological considerations, the limited number of other studies that have investigated the relation between environmental factors and the genetic aberrations. With regard to methodological considerations, we can conclude that the quality of the exposure data and the molecular analyses was satisfactory and that the choice of molecular endpoints was appropriate with regard to their proposed relevance to colorectal tumourigenesis, and did not result in important misclassification. It seems unlikely that the results were subject to extensive bias due to loss to follow-up of tumour tissue or the success rate of the molecular analyses. However, including different molecular endpoints in our analyses inevitably led to multiple testing and considering that our results are not always in line with the very limited number of publications of this kind, they have to be treated with some caution. It is impossible to draw firm conclusions on the role of dietary and lifestyle factors in the initiation or progression of the carcinogenic process, as the findings are derived from an observational study. Overall, our results support the hypothesis that various environmental exposures contribute differently to colorectal cancer risk depending on the genetic alterations that are considered to be important to its development. More research in this area is warranted and should ideally include more than one molecular endpoint as this seems to describe the heterogeneity in tumours more accurately than one single genetic feature.

SAMENVATTING

Colorectalkanker treft wereldwijd een groot aantal mensen, met name in westerse landen. Zoals andere vormen van kanker, is kanker van het colon en het rectum een multifactoriële aandoening. Afgezien van een toenemende leeftijd en een positieve familiegeschiedenis van colorectaal kanker, zijn voedings- en leefstijlfactoren voor de hand liggende factoren die het risico op colorectalkanker beïnvloeden. Een hoge inname van vet, vlees en alcohol alsmede het roken van sigaretten verhogen waarschijnlijk het risico op het ontwikkelen van een colorectaltumor, terwijl de consumptie van groente, vezel en mogelijk fruit het risico zou verkleinen. De gevonden associaties zijn echter vaak zwak en soms inconsistent.

De meerderheid van colorectaal carcinomen ontstaat via een serie goed gedefinieerde histopathologische veranderingen, welke bekend staat als de adenoom-carcinoom sequentie. Het mechanisme dat ten grondslag ligt aan de ontwikkeling van colorectalkanker is het algemeen geaccepteerde paradigma van de stapsgewijze accumulatie van genetische veranderingen in de adenomateuze polyposis coli (*APC*), Kirsten ras (*K-ras*), en tumour protein 53 (*TP53*) genen. Buiten mutaties in specifieke genen, worden de meeste colorectaal tumoren gekenmerkt door chromosomale of microsatelliet instabiliteit. In de meerderheid van de colorectaal tumoren wordt chromosomale instabiliteit waargenomen. Een kleiner deel (10 tot 15%) wordt gekenmerkt door microsatelliet instabiliteit, die in ongeveer 90% van de sporadische colorectaal tumoren gerelateerd is aan een defecte human Mut-L homologue 1 (*hMLH1*) functie. Deze twee vormen van genetische instabiliteit lijken specifieke ontwikkelingsroutes te vertegenwoordigen en weerspiegelen mogelijk verschillen in etiologie.

Omgevingsfactoren hebben waarschijnlijk een direct effect op de carcinogenese via de inductie van DNA schade die resulteert in mutaties in genen die relevant zijn voor tumorvorming of sturen mogelijkwerwijs de selectie van tumoren met specifieke mutaties. Verschillende moleculaire routes zouden daarom de blootstelling aan verschillende omgevingsfactoren kunnen weerspiegelen. Het doel van de studies die beschreven zijn in dit proefschrift, was om het voorkomen van genetische veranderingen die belangrijk zijn in de vroege ontwikkeling van colorectalkanker te onderzoeken en inzicht te verwerven in de relatie tussen omgevingsfactoren en colorectalkanker en deze genetische veranderingen.

De studies beschreven in dit proefschrift werden uitgevoerd binnen de Nederlandse Cohort Studie naar voeding en kanker (NLCS) die in september 1986 werd gestart. Bij aanvang van de studie vulden 120.852 mannen en vrouwen tussen de 55 en 69 jaar een voedselfrequentie- en leefstijlvragenlijst in. Een subcohort van 3.500 mannelijke en vrouwelijke deelnemers werd aselekt getrokken uit het cohort en werd tweejaarlijks gevolgd om de verzamelde persoonslijst vast te stellen. Via koppeling van het cohort met de Nederlandse Kankerregistratie en het Pathologisch Anatomisch Landelijk Geautomatiseerd Archief (PALGA) konden na 7,3 jaar follow-up van het cohort - en met uitsluiting van de eerste 2,3 jaar - 929 gevallen van colorectalkanker worden geïdentificeerd. Van 737 patiënten kon tumorweefsel worden verzameld, dat gebruikt werd voor de analyse van genetische veranderingen in hun tumoren.

In de studie die beschreven wordt in **hoofdstuk 2**, werd het vóórkomen van en het type mutatie in het APC gen bestudeerd in 665 patiënten van wie de mutatie cluster regio van het APC gen volledig kon worden geanalyseerd. Er werd een groot aantal mutaties gevonden, wat gedeeltelijk toe te schrijven is aan het vóórkomen van multipеле mutaties in 40% van de onderzochte tumoren. Hoewel in 72% van de carcinomen een of meerdere mutaties werd vastgesteld, had slechts 37% van de patiënten een tumor met tenminste één mutatie die zou leiden tot een verkort en daardoor inactief APC eiwit, terwijl 29% van de patiënten tenminste één missense, maar geen functionele mutatie bleek te hebben en 6% had een silent mutatie, maar geen functionele of missense mutatie. Tumoren in het rectosigmoid en rectum hadden relatief vaker een C→T puntmutatie of frameshift mutatie die zouden resulteren in een verkort eiwit in vergelijking met proximale en distale colontumoren, wat mogelijk duidt op een verschil in etiologie tussen het colon en het rectum.

Hoofdstuk 3 beschrijft de studie naar het voorkomen van mutaties in de APC, CTNNB1, K-ras genen en expressie van hMLH1 in 656 carcinomen van welke de analyse van deze moleculaire karakteristieken volledig geanalyseerd kon worden en naar de vergelijking van patiënt- en tumorkarakteristieken op basis van deze genetische veranderingen. Mutaties in de fosforyleringsplaatsen van het CTNNB1 gen dat codeert voor β-catenine waren zeldzaam (5/646). Opvallende verschillen werden waargenomen tussen hMLH1 deficiënte tumoren en tumoren die een functionele APC en/of een activerende K-ras mutatie hadden. Patiënten met een hMLH1-deficiënte tumor waren ouder, vaker vrouwen, hun tumoren waren vaker gelokaliseerd in het proximale colon en waren slechter gedifferentieerd dan patiënten met een tumor die een APC en/of K-ras mutatie bevatten.

Vlees zou een risicofactor voor colorectalkanker kunnen zijn op basis van het gehalte aan dierlijk vet en haemijzer alsook de bereidingswijze. Als gevolg van de verschillen in bereidingswijze kunnen de diverse vleessoorten heterocyclische aromatische amines, polycyclische aromatische koolwaterstoffen en N-nitrosamines bevatten, die specifieke DNA-schade kunnen veroorzaken. Zodoende zouden bestanddelen in vlees het risico op de ontwikkeling van tumoren met verschillende genetische veranderingen (mutaties in het APC gen of mismatch repair deficiëntie) kunnen beïnvloeden. De studie naar de associaties tussen vlees- en visconsumptie en genetische veranderingen in colon- en rectumtumoren, zoals beschreven in **hoofdstuk 4**, liet geen associatie zien tussen de consumptie van totaal vers vlees, gevogelte of vis en het risico op colon- en rectumkanker op zich, noch met tumoren met of zonder specifieke genetische veranderingen. Consumptie van vleeswaren liet echter een positief verband zien met colontumoren die een functionele APC mutatie hadden (relatief risico (RR) 1,61, 95% betrouwbaarheidsinterval (BI) 0,96-2,71 voor het hoogste t.o.v. het laagste kwartiel van inname), terwijl rundvleesconsumptie geassocieerd was met een verhoogd risico op colontumoren zonder een functionele APC mutatie (RR 1,58, 95% BI 1,10-2,25 voor het hoogste t.o.v. het laagste kwartiel van inname). Geen van de vlees- of visvariabelen bleek geassocieerd te zijn met de afwezigheid van hMLH1 expressie, wat leidde tot de conclusie dat verscheidene soorten vlees op verschillende wijze kunnen bijdragen aan de etiologie van colon- en

rectumkanker, afhankelijk van de APC mutatiestatus, maar niet de hMLH1 expressiestatus.

Voedingsvetten kunnen zowel een risicofactor vormen voor de ontwikkeling van colorectalkanker als een beschermend effect hebben, afhankelijk van het type vet. In **hoofdstuk 5** wordt de studie naar de relatie tussen diverse voedingsvetten en moleculaire aspecten van colorectalkanker op basis van de APC en K-ras mutatiestatus en hMLH1 expressiestatus beschreven. Voor totaal, verzadigd en mono-onverzadigd vet werden geen associaties gevonden met het risico op colon- en rectumkanker. Linolzuur, het belangrijkste vetzuur uit de groep meervoudig onverzadigde vetzuren, was geassocieerd met een verhoogd risico op colonkanker met alleen een K-ras mutatie en geen additionele functionele APC mutatie of hMLH1 deficiëntie (RR 6,74, 95% BI 2,36-19,51 voor het hoogste t.o.v. het laagste kwartiel van inname). De inname van linolzuur was niet geassocieerd met het risico op colon tumoren zonder enige genetische afwijking, met tumor die alleen hMLH1 deficiënt waren, noch met tumoren met alleen een APC mutatie. Onze resultaten suggereren dat tumoren met specifieke genetische afwijkingen een unieke etiologie hebben.

Sigarettenrook bevat veel carcinogene stoffen die via direct of systemisch contact met het colorectale epitheel een bijdrage zouden kunnen leveren aan de ontwikkeling van colorectalkanker. Het doel van de studie beschreven in **hoofdstuk 6** was de bijdrage van het roken van sigaretten aan sporadische colorectalkanker te onderzoeken, waarbij rekening werd gehouden met moleculaire veranderingen van de tumoren en de glutathion S-transferase (GST) GSTM1 en GSTT1 genotypen. In vergelijking met mensen die nooit gerookt hebben verhoogde een hoge rookfrequentie het risico op colorectalkanker (RR 1,07, 95% BI 1,03-1,12 per toename van vijf sigaretten per dag) en dit verband was sterker voor tumoren zonder een functionele APC mutatie (RR 1,11, 95% BI 1,05-1,17). Langdurig roken was geassocieerd met tumoren zonder hMLH1 expressie (RR 1,17, 95% BI 1,00-1,37 per toename van 10 jaar). Er werden geen statistisch significante interacties gevonden tussen roken en GSTM1 en GSTT1 genotype. Wij concludeerden dat het roken van sigaretten geassocieerd is met het risico op colorectalkanker en dat deze associatie afhankelijk zou kunnen zijn van de moleculaire karakteristieken van de tumor op basis van de APC mutatie en hMLH1 expressie status.

In **hoofdstuk 7** worden de belangrijkste resultaten van de studies die beschreven zijn in dit proefschrift samengevat en bediscussieerd in het licht van methodologische afwegingen en het beperkt aantal andere studies dat de relatie tussen omgevingsfactoren en genetische afwijkingen heeft onderzocht. Met betrekking tot de methodologische aspecten kunnen we concluderen dat de kwaliteit van de expositiedata en de moleculaire analyses goed was en dat de keuze voor de geanalyseerde eindpunten geschikt was met betrekking tot hun relevantie in de carcinogenese van het colon en rectum en niet geleid heeft tot belangrijke misclassificatie. Het lijkt onwaarschijnlijk dat onze resultaten sterk vertekend zijn door selectie door incomplete follow-up van de tumormateriaal of het succes van de moleculaire analyses. Het apart beschouwen van de verschillende moleculaire eindpunten heeft echter wel geleid tot het doen van multipale analyses. Daarnaast kwamen onze resultaten niet altijd overeen met de resultaten uit de beperkte vergelijkbare literatuur.

Daarom is het van belang onze resultaten met enige terughoudendheid te beschouwen. Over de rol van voedings- en leefstijlfactoren in de initiatie danwel progressie van het carcinogene proces kunnen geen definitieve conclusies worden getrokken, aangezien onze bevindingen afkomstig zijn uit observationeel onderzoek. In het algemeen ondersteunen onze resultaten de hypothese dat blootstelling aan verschillende omgevingsfactoren verschillend bijdraagt aan het risico op colorectalkanker, afhankelijk van de genetische veranderingen die belangrijk worden geacht voor de ontwikkeling ervan. Meer onderzoek op dit gebied is geboden en zou bij voorkeur meer dan één moleculair eindpunt beschouwen, aangezien dit de heterogeniteit van tumoren nauwkeuriger lijkt te beschrijven dan één enkele genetische component.

DANKWOORD

