

# Alcohol consumption as a risk factor for colorectal cancer : an epidemiological study on genetic susceptibility and molecular endpoints

Citation for published version (APA):

Bongaerts, B. W. C. (2008). *Alcohol consumption as a risk factor for colorectal cancer : an epidemiological study on genetic susceptibility and molecular endpoints*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20081016bb>

## Document status and date:

Published: 01/01/2008

## DOI:

[10.26481/dis.20081016bb](https://doi.org/10.26481/dis.20081016bb)

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

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

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# Summary



Consumption of alcohol is an established risk factor for several chronic diseases including cancer. In general, cancer risk increases with the amount of alcohol consumed. To date, alcohol has convincingly been linked to cancers of the head and neck (mouth, pharynx, larynx and esophagus), stomach and breast. Large epidemiological studies have also shown a relationship between the intake of alcohol and an increased risk of colorectal cancer (CRC). Yet, the exact mechanism through which alcohol enhances this risk is still largely unknown. In addition, current knowledge is also lacking with regard to how alcohol relates to CRC risk in men and women separately, and to cancer occurrence in the distinct anatomical sublocalisations of the colorectal tract. Aiming to shed more light on these aspects and to uncover clues for the carcinogenic mechanism, we have extensively studied the effect of total habitual alcohol consumption and intake of alcoholic beverages on the risk of CRC, using data on (a) cancer occurrence according to gender and anatomical subsite, (b) the presence of single nucleotide polymorphisms in the *alcohol dehydrogenase 1C (ADH1C)* gene, which is involved in the metabolism of alcohol, and (c) molecular tumor characteristics to distinguish various cancer subgroups and endpoints. In addition, we performed sensitivity analyses on a subgroup of drinkers that reported to have consumed equal amounts of alcohol five years before baseline as compared to baseline, and we studied alcohol as a potential effect-modifier.

The studies described in this thesis were performed within the ongoing Netherlands Cohort Study on diet and cancer (NLCS). The NLCS was initiated in September 1986. A total of 120,852 men and women aged 55 to 69 years, returned a self-administered questionnaire on habitual dietary habits and alcohol consumption, life style and other risk factors for cancer. According to the case-cohort approach, a randomly drawn subcohort consisting of 5,000 men and women, is followed up biennially for vital status to estimate the accumulating person time at risk, whereas the entire cohort is followed up annually for cancer occurrence. During the present research the total follow-up time was 13.3 years. Between August 1999 and December 2001, tumor material was collected from cases that were diagnosed with CRC within the first 7.3 years of follow-up. The DNA in these samples was used for molecular characterization of the tumors. In December 2000, members of the subcohort were contacted for the collection of mouth swabs, and DNA was isolated from these swabs to enable the studying of gene-environment interactions within the NLCS.

In the study described in **chapter 2**, we examined the overall associations between alcohol intake and the risk of CRC. Since we did not use molecular data, information of up to 13.3 years of follow-up was available. A habitual daily alcohol consumption of 30 grams (approximately three alcoholic drinks) or more was associated with a 30% increase in risk of CRC, when compared to abstaining. However, baseline consumption levels may be subject to misclassification of former drinkers and drinkers with changed drinking habits. This may lead to a certain level of noise in the risk estimates for disease, namely the more valid an exposure measurement, the more accurate the risk estimates. Subsequently, the analyses were restricted to a subgroup of drinkers that reported to have consumed equal amounts of alcohol five years before baseline, compared to baseline drinking levels. The reference group consisted of baseline abstainers that reported to have abstained from alcohol five years before baseline. The results now showed a 53% increase in CRC risk for consumers of  $\geq 30.0$  grams of alcohol per day, indicating that information on drinking habits in the past is a valuable addition to information on baseline alcohol consumption. Although we found no evidence for a sex-specific relationship between alcohol intake and risk of CRC, there were indications for a subsite-specific effect of alcohol. For consumers of  $\geq 30.0$  grams of alcohol per day, there seemed to be a gradient of increasing risk from the proximal colon (29% increase in cancer risk) through the rectum (a 69% increase in cancer risk). Finally, analyses of different types of alcoholic beverages showed that CRC risk was likely to be affected by the alcohol content of the beverages, rather than by other beverage constituents.

Functional polymorphisms in genes involved in the metabolism of alcohol may underlie a potential genetic susceptibility to alcohol-related CRC. In the study described in **chapter 3**, we studied whether associations between alcohol and CRC risk were likely to differ according to the *ADH1C* genotype. A possible indication for this was only observed among the subgroup of drinkers that reported to have consumed equal amounts of alcohol five years before baseline, compared to baseline. The highest risk of CRC was restricted to drinkers of  $\geq 30.0$  g/d with the *ADH1C\*2/\*2* genotype, relative to the reference group of abstainers with the *ADH1C\*1/\*1* genotype. Also, consumption of  $\geq 30.0$  g/d in combination with the heterozygous *ADH1C\*1/\*2* genotype was associated with an increased risk of CRC, when compared to the reference group. Yet, the elevated risk estimates and the

interaction term for *ADH1C* genotype and alcohol intake were not statistically significant.

In order to gain further insight into the specific role of alcohol with regard to the colorectal carcinogenic mechanism, we studied three subgroups of tumors. These subgroups were based on tumors with similar molecular characteristics and may represent proxies for distinct etiological pathways (**chapter 4**). Although the numbers of cases in some of these subgroups were small, the results all pointed towards a positive relationship. A daily alcohol consumption of  $\geq 30.0$  g seemed associated with an increased risk of colorectal tumors characterized by (a) either a truncating *APC* mutation, an activating *KRAS* mutation or overexpression of TP53 (as a proxy for the chromosomally unstable (CIN) pathway); and (b) tumors lacking expression of MLH1 (as a proxy for the microsatellite instable (MSI) pathway) and (c) tumors that did not harbor any of these aberrations (as a proxy for a pathway other than the CIN or MSI pathway). As such, alcohol may be more likely to exert an overall effect, instead of an effect limited to specific genes or molecular events.

In addition to genetic abnormalities, CRC may also be characterized by epigenetic aberrations. Therefore, we studied associations between consumption of alcohol and tumors expressing MSI and MSI-related aberrations, i.e., *MLH1* hypermethylation, absence of MLH1 expression and presence of *BRAF* oncogene mutations (**chapter 5**). For these analyses the MSI status was available as assessed according to a series of pre-described MSI markers. Despite small numbers of cases, all risk estimates for high alcohol consumers, relative to abstainers, pointed towards an increased risk of CRC harboring MSI and the studied MSI-related defects. To examine the possibility that alcohol may contribute to CRC through counteracting the methyl donors folate and methionine – factors both suggested of having a protective effect against the development of CRC – we examined the modifying effect of alcohol on associations between folate and methionine and colorectal tumors harboring MSI and MSI-related aberrations. For none of the examined molecular endpoints the interaction term between alcohol and folate, and between alcohol and methionine, reached statistical significance.

Finally, we examined in **chapter 6** if alcohol consumption was related to single genetic aberrations, i.e. a point mutation in the *KRAS* gene. We studied two hypotheses: (a) alcohol consumption may predispose to CRC by causing mutations in

the *KRAS* oncogene - one of the key genes involved in the carcinogenic process - and (b) beer consumption is associated with G>A mutations in this gene. Compared to abstaining, a daily alcohol intake of  $\geq 30.0$  g seemed positively associated with the risk of colorectal tumors harboring a *KRAS* mutation. Yet, the same was true for colorectal tumors without a *KRAS* mutation. We did not find strong indications for a relationship between beer consumption and the risk of CRC harboring a G>A mutation in the gene. As such, the results suggested that the induction of *KRAS* mutations is not a predominant mechanism in alcohol-related colorectal carcinogenesis.

In **chapter 7**, the main findings of the studies described in this thesis are summarized. Several aspects are discussed regarding assessment of alcohol exposure, stressing the importance of additional measurement of consumption habits in the (recent) past as a means of reducing misclassification of former drinkers. Taking into account several points of attention with regard to analyzing the effect of alcohol and alcoholic beverages, we elaborate on the use of statistical methods to analyze the effect of an alcoholic beverage independent of its alcoholic content and subsequent implications for interpretation of the results. Furthermore, the relevance of genetic polymorphisms and genetic and molecular endpoints to increase the insights into the carcinogenic mechanisms are discussed. The genetic epidemiological studies that have been performed to date, have appeared too small to yield consistent results and to allow clear conclusions on the role of alcohol in CRC. Since the initiation of new large molecular studies is very time consuming and financially unattractive, pooling of existing genetic and molecular data may be a good alternative for future analyses. Chapter 7 continues with a discussion on the implications of the study results. These results do not require a revision of our Dutch guidelines for safe alcohol use. Finally, suggestions for future research are given, and we conclude that there is a growing need for a proper understanding of alcohol-related CRC. This would be very helpful to adequately deal with the consequences of the rising rates of both alcohol consumption and CRC diagnoses.

# Samenvatting





Consumptie van alcohol is een bekende risicofactor voor verschillende chronische aandoeningen, waaronder kanker. In het algemeen neemt het risico op kanker toe naarmate de hoeveelheid alcohol die gedronken wordt toeneemt. Tegenwoordig bestaat er overtuigend bewijs dat alcohol gerelateerd is aan het optreden van hoofd-hals tumoren (mond, mondholte, keelholte en slokdarm), maagkanker en borstkanker. Grote epidemiologische studies hebben aangetoond dat er ook een relatie bestaat tussen de inname van alcohol en een verhoogd risico op dikke darmkanker. Echter, het precieze mechanisme waarlangs alcohol het risico op dikke darmkanker zou verhogen is nog grotendeels onbekend. Daarnaast is ook nog niet duidelijk of de risico's op alcoholgerelateerde dikke darmkanker even groot zijn voor mannen en vrouwen, en of deze risico's onderling verschillen voor de afzonderlijke anatomisch subgebieden van de dikke darm. In een poging om meer inzicht te krijgen in de bovengenoemde aspecten en het mechanisme van carcinogenese, hebben we het effect van de totale dagelijkse alcoholconsumptie, en van de inname van alcoholische dranken, op het risico op dikke darmkanker uitvoerig onderzocht. Hierbij is gebruik gemaakt van gegevens over (a) het geslacht van de onderzoeksdeelnemers en de anatomische sublokalisatie van de tumor, (b) de aan- en afwezigheid van een functioneel genetisch polymorfisme in het *alcohol dehydrogenase 1C (ADH1C)* gen, dat betrokken is bij het alcohol metabolisme, en (c) moleculaire tumorkarakteristieken om verschillende tumorsubgroepen en -eindpunten te kunnen onderscheiden.

De studies die in dit proefschrift zijn beschreven, zijn uitgevoerd binnen de lopende Nederlandse Cohort Studie naar voeding en kanker (NLCS). De NLCS is in september 1986 geïnitieerd. In totaal hebben 120.852 mannen en vrouwen in de leeftijd van 55 tot 69 jaar, een vragenlijst retour gezonden over hun gebruikelijke eetgewoonten en alcoholconsumptie, leefstijl en andere risicofactoren voor kanker. De NLCS hanteert het zogenoemde case-cohort design. Een aselekt getrokken steekproef uit het cohort, het subcohort bestaande uit 5.000 mannen en vrouwen, wordt tweejaarlijks gecontroleerd op vitale status voor een schatting van de opgebouwde persoonstijd in het cohort. Voor het hele cohort wordt jaarlijks het optreden van kanker vastgesteld. Ten tijde van het huidige onderzoek was de totale follow-upduur 13,3 jaar. Tussen augustus 1999 en december 2001 is tumormateriaal verzameld van alle dikke darmkankerpatiënten die gediagnosticeerd zijn binnen de eerste 7,3 jaar follow-up van het cohort. In het DNA uit dit tumorweefsel zijn vooraf moleculaire en genetische afwijkingen van de tumor bepaald. In december 2000 zijn de leden van

het subcohort gevraagd om wangslijmvliesmonsters te verzamelen. Hieruit is DNA geëxtraheerd ten behoeve van onderzoek naar gen-omgevingsinteracties binnen de NLCS.

In de studie die beschreven is in **hoofdstuk 2**, hebben we het verband tussen alcoholinname en het risico op dikke darmkanker bestudeerd. Omdat in dit onderzoek geen gebruik is gemaakt van moleculaire data, stond ons de informatie van 13,3 jaar follow-up ter beschikking. Een gemiddelde dagelijkse alcoholinname van 30 gram (ongeveer drie alcoholische consumpties) en meer, was geassocieerd met een 30% hoger risico op dikke darmkanker ten opzichte van geheelonthouding. Echter, het indelen van de deelnemers in categorieën op grond van hun gerapporteerde alcoholinname aan het begin van de studie, kan onderhevig zijn aan misclassificatie van ex-drinkers en drinkers met veranderde drinkgewoonten. Dit kan aanleiding geven tot een zekere mate van ruis in de risicoschattingen voor ziekte. Immers hoe meer valide het blootstellingsniveau kan worden gemeten, des te accurater de uiteindelijke risicoschattingen zullen zijn. Aldus zijn de analyses vervolgens beperkt tot een subgroep van drinkers die aangegeven heeft vijf jaar voor de beginmeting vergelijkbare hoeveelheden alcohol te hebben gedronken, als ten tijde van de beginmeting. De referentie groep betrof hier de subgroep van geheelonthouders die rapporteerden dat zij zich vijf jaar voor de beginmeting ook van alcohol onthielden. De resultaten toonden nu een 53% hoger risico op dikke darmkanker voor drinkers van  $\geq 30.0$  gram alcohol per dag. Het verkeerdt classifiëren van voormalige drinkers en drinkers met veranderde consumptiegewoonten werd geminimaliseerd waardoor een meer valide schatting van het risico op ziekte mogelijk werd. Informatie over drinkgewoonten in het verleden bleek dus een waardevolle aanvulling te zijn op gegevens over alcoholconsumptie ten tijde van de beginmeting. Er waren geen verdere aanwijzingen dat het verband tussen alcoholinname en het risico op dikke darmkanker geslachtsspecifiek zou zijn, al waren er wel aanwijzingen dat het verband samenhang met de anatomische sublokalisaties van de dikke darm. Voor drinkers van  $\geq 30.0$  gram alcohol per dag leek het kankerrisico toe te nemen vanaf het voorste deel van de dikke darm (een 29% verhoogd risico) tot en met het rectum (een 69% verhoogd risico). Tenslotte wezen analyses van de verschillende typen alcoholische dranken erop dat hoogst waarschijnlijk de alcohol hierin het risico op dikke darmkanker verhoogt, in tegenstelling tot de overige bestanddelen van deze dranken.

Functionele genetische polymorfismen in genen die betrokken zijn bij het alcoholmetabolisme, kunnen ten grondslag liggen aan een genetische gevoeligheid voor alcoholgerelateerde dikke darmkanker. In de studie die beschreven is in **hoofdstuk 3** hebben we onderzocht of het verband tussen alcohol en dikke darmkanker verschilt al naar gelang het *ADH1C* genotype. Een mogelijke indicatie hiervoor werd echter alleen gezien voor de subgroep van drinkers die aangaf vijf jaar voor de beginmeting vergelijkbare hoeveelheden alcohol te hebben gedronken als ten tijde van de beginmeting. Drinkers van  $\geq 30.0$  gram alcohol per dag met het *ADH1C\*2/\*2* genotype leken het hoogste risico op dikke darmkanker te hebben, vergeleken met de referentiegroep van geheelonthouders met het *ADH1C\*1/\*1* genotype. Maar ook het drinken van  $\geq 30.0$  gram alcohol per dag in combinatie met het heterozygote *ADH1C\*1/\*2* genotype was geassocieerd met een verhoogd risico op dikke darmkanker, ten opzichte van de genoemde referentiegroep. De interactieterm voor *ADH1C* genotype en alcoholinname was echter niet statistisch significant.

Om meer inzicht te verkrijgen in de rol van alcohol bij de ontwikkeling van dikke darmkanker hebben we drie subgroepen van tumoren bestudeerd. Deze subgroepen zijn gevormd op basis van tumoren met gelijke moleculaire karakteristieken en kunnen mogelijk als representanten gelden voor verschillende ontstaanswijzen. Hoewel de aantallen cases in sommige subgroepen klein waren, wezen de resultaten alle in de richting van een positief verband. Een dagelijkse consumptie van  $\geq 30.0$  gram alcohol was geassocieerd met een verhoogd risico op (a) dikke darmtumoren met een trunkerende *APC* mutatie en/of een activerende *KRAS* mutatie en/of overexpressie van het TP53 eiwit (als representanten voor de chromosomaal instabiele (CIN) ontstaanswijze), (b) dikke darmtumoren met een ontbrekende MLH1 expressie (als representanten voor de microsatelliet instabiele (MSI) ontstaanswijze), en (c) dikke darmtumoren zonder de bovengenoemde afwijkingen (als representanten voor een ontstaanswijze anders dan CIN en MSI) (**hoofdstuk 4**). Alcoholconsumptie leek dus eerder een algemeen effect te hebben op dikke darmkanker dan een effect dat beperkt was tot tumoren met specifieke moleculaire afwijkingen.

Omdat dikke darmkanker naast genetische afwijkingen ook gekenmerkt kan zijn door epigenetische abnormaliteiten, hebben we in **hoofdstuk 5** relaties bestudeerd tussen alcoholconsumptie en tumoren met MSI en MSI-gerelateerde afwijkingen, te weten

*MLH1* hypermethylering, afwezigheid van *MLH1* expressie en aanwezigheid van *BRAF* oncogen mutaties. Voor deze analyses was de MSI status beschikbaar zoals bepaald aan de hand van een serie voorgeschreven MSI markers. Ondanks de kleine aantallen patiënten in sommige subgroepen wezen de risicoschattingen voor de zware alcoholdrinkers in vergelijking met geheelonthouders, in de richting van een verhoogd risico op dikke darmtumoren met MSI en de bestudeerde MSI-gerelateerde afwijkingen. Om te bestuderen of alcohol mogelijk bijdraagt aan dikke darmkanker door het tegenwerken van de methylendonoren folaat en methionine - factoren met een verondersteld beschermende werking tegen dikke darmkanker - hebben we bestudeerd of alcohol de associaties tussen folaat en methionine en dikke darmtumoren met MSI en MSI-gerelateerde afwijkingen wellicht kon modificeren. Echter, voor geen van de onderzochte moleculaire eindpunten was de interactieterm tussen alcohol en folaat, en tussen alcohol en methionine, statistisch significant.

Tenslotte is in **hoofdstuk 6** onderzocht of er een verband bestond tussen alcoholinname en een enkelvoudige genetische afwijking, namelijk een puntmutatie in het *KRAS* gen. We hebben twee hypothesen bestudeerd: (a) alcoholinname leidt tot dikke darmkanker door het veroorzaken van mutaties in het *KRAS* oncogen - een van de sleutelgenen betrokken bij de ontwikkeling van dikke darmkanker - en (b) bierconsumptie is gerelateerd met G>A mutaties in dit gen. Vergeleken met geheelonthouding was een dagelijkse inname van  $\geq 30.0$  gram alcohol geassocieerd met het risico op dikke darmtumoren met een *KRAS* mutatie. Hetzelfde gold echter ook voor dikke darmtumoren zonder een *KRAS* mutatie. We vonden verder geen sterke aanwijzingen voor een verband tussen bierconsumptie en dikke darmtumoren met een G>A mutatie in het *KRAS* gen. Aldus lijken de bevindingen te suggereren dat een alcoholgerelateerde ontwikkeling van dikke darmkanker niet verloopt via het veroorzaken van (specifieke) *KRAS* mutaties.

In **hoofdstuk 7** zijn de belangrijkste bevindingen samengevat van de studies beschreven in dit proefschrift. Verscheidene aspecten met betrekking tot het bepalen van de blootstelling aan alcohol worden besproken, waarbij het belang van navraag naar drinkgewoonten in het ( nabije) verleden wordt benadrukt als belangrijk middel om misclassificatie van voormalige drinkers te minimaliseren. Met het oog op het analyseren van de effecten van alcohol en alcoholische dranken, gaan we nader in op het gebruik van statistische methoden om het effect van een alcoholische drank onafhankelijk van zijn alcoholische inhoud te analyseren. De hiermee

samenhangende implicaties voor een correcte interpretatie van de resultaten worden besproken. Vervolgens wordt het gebruik van genetische polymorfismen en moleculaire eindpunten om inzicht te verkrijgen in de verschillende carcinogene mechanismen ter discussie gesteld. De genetisch epidemiologische studies die tot op heden zijn uitgevoerd, zijn te klein gebleken om eenduidige resultaten te verkrijgen en om duidelijke conclusies te kunnen trekken omtrent de rol van alcohol in het ontstaan van dikke darmkanker. Omdat het opzetten van grote nieuwe moleculaire studies zeer tijdrovend en financieel onaantrekkelijk is, kan het samenvoegen van bestaande genetische en moleculaire data een goed alternatief bieden voor toekomstige analyses. In hoofdstuk 7 bediscussiëren we voorts de implicaties van de studieresultaten. Onze bevindingen zijn geen aanleiding om de huidige Nederlandse richtlijnen betreffende een veilig alcoholgebruik te herzien. Tenslotte geven we suggesties voor toekomstig onderzoek naar alcoholconsumptie en dikke darmkanker, waarna we eindigen met de conclusie dat er een groeiende behoefte is aan een goed inzicht in alcoholgerelateerde dikke darmkanker. Alleen dan kan beter geanticipeerd worden op de consequenties die een toename van zowel alcoholconsumptie als het aantal gevallen van dikke darmkanker met zich mee brengen