

# The role of intestinal microbiota in colorectal and breast cancer treatment

## Citation for published version (APA):

Aarnoutse, R. (2021). *The role of intestinal microbiota in colorectal and breast cancer treatment: a pathway to personalised medicine?* [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20211203ra>

## Document status and date:

Published: 01/01/2021

## DOI:

[10.26481/dis.20211203ra](https://doi.org/10.26481/dis.20211203ra)

## 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

The overall aim of this thesis was to investigate the role of intestinal microbiota in cancer and systemic cancer therapy exploring new predictive, prognostic, and therapeutic targets. This thesis has focussed on cancer patients treated with systemic cancer therapy and especially on colorectal and breast cancer patients treated with chemotherapy.

### The role of intestinal microbiota in systemic cancer therapy

**Chapter 2** provides an overview of all relevant clinical studies performed until April 22<sup>nd</sup> 2019 that described the clinical association between baseline intestinal microbiota and systemic cancer therapy outcome as well as therapy-related changes in intestinal microbiota composition. The systematic literature search identified 23 articles. There were strong indications for a close association between the intestinal microbiota and immunotherapy related tumour response, survival, and toxicity. Furthermore, the development of chemotherapy-induced infectious complications seemed to be associated with the baseline intestinal microbiota. Both chemotherapy and immunotherapy induced drastic changes in intestinal microbiota composition with possible consequences for treatment efficacy in cancer patients. Evidence of an interaction between intestinal microbiota and hormonal therapy was very limited. Large heterogeneity concerning study design, study population, and faecal microbiota analysis techniques limited comparability and generalizability of results. Despite some studies identified associations between intestinal microbiota and tumour response or therapy induced changes, this is only based on a limited number of studies. Additional longitudinal clinical research is essential to confirm previous results and further identify prognostic and therapeutic microbial targets.

### The role of intestinal microbiota in colorectal cancer treatment with chemotherapy

**Chapter 3** presents our study protocol of a prospective multicentre cohort study on the role of intestinal microbiota in colorectal cancer treatment. The study aimed to explore whether baseline intestinal microbiota composition is associated with response or chemotherapy toxicity in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with capecitabine or trifluridine/tipiracil. Moreover, the study aimed to explore the influence of capecitabine and trifluridine/tipiracil on intestinal microbiota over the course of chemotherapy. Before, during, and after three cycles of systemic treatment with capecitabine or trifluridine/tipiracil, faecal samples and questionnaires concerning

compliance, chemotherapy toxicity and quality of life were collected. Response was measured by CT or MRI using RECIST-criteria. Intestinal microbiota was analysed by amplicon sequencing of the 16S rRNA V4 hypervariable gene-region.

**Chapter 4** described the results of the study presented in chapter 3. With longitudinal faecal sampling, we explored the role of intestinal microbiota in 33 mCRC patients treated with capecitabine. In total, 90 faecal samples were collected. Intestinal microbiota analyses with amplicon sequencing of the 16S rRNA V4 hypervariable gene-region showed that intestinal microbiota composition and diversity before, during, and after three cycles of capecitabine were not associated with response. In addition, capecitabine did not induce significant changes in the intestinal microbiota composition and diversity during the treatment period. Individual specific microbial shifts as a result of antibiotic therapy during capecitabine treatment were observed. Since this is the first clinical study with longitudinal intestinal microbiota sampling in mCRC patients that explored the interaction between capecitabine and the intestinal microbiota, additional longitudinal studies using larger cohorts, longer follow-up, and performing functional microbiota analyses will be highly relevant to further investigate intestinal microbiota-therapy interactions in mCRC patients.

## The role of intestinal microbiota in breast cancer and during breast cancer treatment with chemotherapy

In **chapter 5** we investigated with longitudinal faecal sampling the role of intestinal microbiota in postmenopausal oestrogen receptor positive (ER+) and human epidermal growth factor receptor-2 negative (HER2-) breast cancer patients treated with (neo)adjuvant chemotherapy with adriamycin (A), cyclophosphamide (C) and docetaxel (D). In total, 44 patients were included and 153 faecal samples were collected. Patients collected a faecal sample and completed a questionnaire before, during AC, during D and after completing chemotherapy, resulting in 28 paired samples. Pathologic tumour response after neoadjuvant AC-D treatment was assessed using the scoring system according to European Society of Breast Cancer Specialists (EUSOMA). Intestinal microbiota analyses with amplicon sequencing of the 16S rRNA V4 hypervariable gene-region showed that baseline intestinal microbiota was not associated with pathological response in neoadjuvant treated patients. However, our study showed that observed species richness reduced significantly during the course of AC-D in (neo)adjuvant treated patients. The abundance of Proteobacteria, unclassified Enterobacterales, and *Lactobacillus* significantly increased during AC-D treatment. After AC-D treatment, the abundance of Proteobacteria and unclassified Enterobacterales significantly decreased

to levels comparable to baseline. Contrary, the abundance of *Ruminococcaceae* NK4A214 group, *Marvinbryantia*, *Christensenellaceae* R7 group, and *Ruminococcaceae* UCG-005 significantly decreased during the course of AC-D treatment. Patients with any grade diarrhoea during docetaxel had a significantly lower observed species richness compared to patients without diarrhoea. Diarrhoea was not correlated to antibiotic administration. We concluded that results from this first longitudinal clinical study in postmenopausal breast cancer patients indicate that AC-D treatment reduced observed species richness and induced subsequent shifts of specific bacterial taxa. Furthermore, diarrhoea was associated with lower microbial diversity.

In **chapter 6** we aimed to investigate if the intestinal microbiota of postmenopausal breast cancer patients differs from postmenopausal women without breast cancer. We compared the intestinal microbiota richness, diversity, and composition of 81 postmenopausal histologically confirmed ER+ and HER2- breast cancer patients and 67 postmenopausal healthy controls enrolled from the National Dutch Breast Cancer Screening Programme. Patients scheduled for (neo)adjuvant AC-D followed by endocrine therapy, or endocrine therapy (tamoxifen) were prospectively enrolled in a multicentre cohort study in the Netherlands. Patients collected a faecal sample and completed a questionnaire before starting systemic cancer treatment. In total, 148 faecal samples were collected. Intestinal microbiota was analysed by amplicon sequencing of the 16S rRNA V4 gene-region. Observed species richness, Shannon index, and overall microbial community structure were not significantly different between breast cancer patients and healthy controls. There was a significant difference in overall microbial community structure between patients who received recent breast cancer surgery, patient without recent breast cancer surgery, and healthy controls on phylum ( $p=0.042$ ) and genus level ( $p=0.015$ ). *Dialister* ( $p=0.001$ ) and its corresponding family Veillonellaceae ( $p=0.001$ ) were higher in patients who received recent breast cancer surgery, compared to patients without recent breast cancer surgery. Within the recent breast cancer surgery group, this higher abundance of *Dialister* and Veillonellaceae was not associated with intravenous prophylactic antibiotic administration with cefazolin. We concluded that intestinal microbiota richness, diversity and composition are not associated with postmenopausal breast cancer. This study identified that *Dialister* and Veillonellaceae were increased in patients who had received recent breast cancer surgery, independent of intravenous prophylactic cefazolin administration during recent breast cancer surgery, suggesting potential antibiotic-independent microbiota-modulating effects of breast cancer surgery.

**Chapter 7** presents a literature review on the role of breast microbiota as a biomarker for breast cancer and therapeutic response. Breast cancer tissue contains its own unique microbiota. Emerging preclinical data implicates that breast microbiota dysbiosis contributes to breast cancer initiation and progression. Furthermore, the breast microbiota may be a promising biomarker for treatment selection and prognosis. Differences in breast microbiota composition have been found between breast cancer subtypes and disease severities that may contribute to immunosuppression, enabling tumour cells to evade immune destruction. Interactions between breast microbiota, intestinal microbiota, and the immune system are proposed, which all form potential targets to increase therapeutic efficacy. Identifying breast and gut microbial compositions that acquire a positive outcome to certain systemic cancer therapies could significantly reduce cancer burden.

## Samenvatting

Dit proefschrift onderzocht de rol van de darmmicrobiota bij kanker en de systemische behandeling daarvan. Hierbij werd gekeken of de darmmicrobiota een rol kan spelen als diagnostische, prognostische of therapeutische marker. Dit proefschrift richt zich met name op kankerpatiënten die behandeld worden met systemische kankertherapie zoals immunotherapie, chemotherapie of hormonale therapie en in het bijzonder op darm- en borstkankerpatiënten die behandeld worden met chemotherapie.

### De rol van de darmmicrobiota bij de behandeling van kanker met systemische kankertherapie.

**Hoofdstuk 2** geeft een overzicht van alle relevante klinische studies die onderzochten of er een associatie was tussen de darmmicrobiota voorafgaand aan de therapie, de tumorrespons en bijwerkingen alsmede de invloed van de systemische kankertherapie op de darmmicrobiota. Door middel van een systematisch literatuuronderzoek werden 23 artikelen geïdentificeerd. Er waren sterke aanwijzingen voor een associatie tussen de darmmicrobiota en immunotherapie geïnduceerde tumorrespons, overleving en bijwerkingen. Chemotherapie geïnduceerde infectieuze bijwerkingen waren geassocieerd met een specifieke samenstelling van de darmmicrobiota voorafgaand aan behandeling. Zowel chemotherapie als immunotherapie zorgde voor een verandering in de samenstelling van de darmmicrobiota, met mogelijk gevolgen voor de effectiviteit van die kankerbehandeling. Er was erg weinig bewijs beschikbaar over een mogelijke interactie tussen darmmicrobiota en hormoontherapie. Verder werd geconcludeerd dat er veel heterogeniteit in de opzet, populatie en microbiota analysetechnieken tussen de verschillende studies aanwezig was. Hierdoor werd de vergelijkbaarheid van de studies sterk beperkt. Ondanks dat sommige studies een associatie vonden tussen darmmicrobiota en tumorrespons of bijwerkingen, zijn deze bevindingen gebaseerd op een beperkt aantal beschikbare studies. Aanvullend klinisch onderzoek is daarom noodzakelijk om bovenstaande resultaten te bevestigen en om de rol van de darmmicrobiota als prognostische en therapeutische marker verder te onderzoeken.

### De rol van de darmmicrobiota bij de behandeling van darmkanker met chemotherapie

In **hoofdstuk 3** wordt het studieprotocol van een exploratieve observationele cohortstudie gepresenteerd waarbij de rol van de darmmicrobiota bij darmkanker onderzocht wordt. Het doel was om bij patiënten met uitgezaaide darmkanker die

behandeld worden met capecitabine of trifluridine/tipiracil te onderzoeken of de samenstelling van de darmmicrobiota voor de start van chemotherapie geassocieerd is met tumorrespons en/of bijwerkingen. Daarnaast werd onderzocht of capecitabine of trifluridine/tipiracil de samenstelling van de darmmicrobiota beïnvloeden. Voor, tijdens en na drie kuren chemotherapie met capecitabine of trifluridine/tipiracil werden ontlastingsmonsters en vragenlijsten over de kwaliteit van leven, bijwerkingen en therapietrouw verzameld. Tumorrespons werd bepaald door CT- of MRI-scans te beoordelen met de RECIST-criteria. De darmmicrobiota werd geanalyseerd door middel van amplicon sequencing van de 16S rRNA V4 hypervariabele gen-regio.

In **hoofdstuk 4** worden de eerste resultaten uit de studie zoals beschreven in hoofdstuk 3 gepresenteerd. Door longitudinale verzameling van ontlastingsmonsters hebben we de rol van de darmmicrobiota bij patiënten met uitgezaaide darmkanker die behandeld werden met capecitabine onderzocht. In totaal werden er 33 patiënten geïncludeerd en 90 ontlastingsmonsters geanalyseerd. Uit de resultaten bleek dat de samenstelling en diversiteit van de darmmicrobiota voor, tijdens en na drie kuren chemotherapie niet geassocieerd zijn met tumorrespons. Daarnaast werd gevonden dat er gedurende drie kuren capecitabine geen significante veranderingen in de samenstelling of diversiteit van de darmmicrobiota ontstonden. Echter, individuele verschuivingen van specifieke microbiota ten gevolge van antibiotica toediening gedurende de capecitabine behandeling werden wel geobserveerd. Omdat dit de eerste longitudinale klinische studie is die de darmmicrobiota onderzoekt in deze patiëntenpopulatie, zijn aanvullende longitudinale studies met onder andere grotere cohorten, een langere opvolgperiode en functionele microbiota analyses nodig. Hiermee kunnen de bovenbeschreven observaties en microbiota-therapie interacties verder worden geëxploreerd.

## De rol van de darmmicrobiota bij borstkanker en de behandeling van borstkanker met chemotherapie

In **hoofdstuk 5** hebben we door middel van het longitudinaal verzamelen van ontlastingsmonsters de rol van de darmmicrobiota onderzocht bij postmenopauzale borstkankerpatiënten. Patiënten die deelname aan het onderzoek hadden een oestrogeen receptor positieve (ER+) en humane epidermale groei factor receptor-2 negatieve (HER2-) tumor die behandeld werd met (neo)adjuvante chemotherapie bestaande uit vier kuren adriamycine (A) en cyclofosfamide (C) gevolgd door vier kuren docetaxel (D). Patiënten verzamelden een ontlastingsmonster en vulden een vragenlijst in over de kwaliteit van leven en bijwerkingen van de chemotherapie voor de start van

AC, tijdens AC, tijdens D en een maand na de laatste D toediening. Er werden hiervoor 44 patiënten geïncubeerd en 153 ontlastingsmonsters verzameld. In totaal werden er van 28 patiënten vier opeenvolgende monsters verzameld. Pathologische tumorrespons na neoadjuvante chemotherapie werd beoordeeld met het scoringssysteem volgens de European Society of Breast Cancer Specialist (EUSOMA). De darmmicrobiota werd geanalyseerd door middel van amplicon sequencing van de 16S rRNA V4 hypervariable gen-regio. De analyses lieten zien dat de samenstelling van de darmmicrobiota voorafgaand aan neoadjuvante chemotherapie niet geassocieerd was met pathologische tumorrespons. Echter, gedurende de chemotherapie behandeling nam de rijkheid aan bacteriesoorten significant af. Tijdens de chemotherapie behandeling namen de relatieve hoeveelheden Proteobacteriën, ongeclassificeerde Enterobacterales en *Lactobacilli* significant toe. Na de chemotherapie behandeling keerden de relatieve hoeveelheden Proteobacteriën en ongeclassificeerde Enterobacterales terug naar een vergelijkbaar niveau als voor de start van de chemotherapie. Daarentegen namen de relatieve aantallen van *Ruminococcaceae NK4A214 group*, *Marvinbryantia*, *Christensenellaceae R7 group*, en *Ruminococcaceae UCG-005* tijdens de chemotherapie behandeling significant af. Patiënten met diarree tijdens de docetaxel behandeling hadden een significant lagere bacteriële soortenrijkheid in vergelijking tot patiënten zonder enige vorm van diarree. Diarree was niet gecorreleerd met antibiotica gebruik. We concludeerden dat dit de eerste longitudinale klinische studie is bij postmenopauzale ER+ en HER2- borstkankerpatiënten die laat zien dat chemotherapie behandeling bestaande uit AC-D het aantal bacteriesoorten in de darm vermindert en voor verschuivingen in de hoeveelheden van specifieke bacteriële taxa kan zorgen. Daarnaast was diarree, tijdens docetaxel behandeling, geassocieerd met een lager aantal bacteriesoorten en een lagere bacteriële biodiversiteit.

In **hoofdstuk 6** werd onderzocht of er een verschil was in darmmicrobiota tussen postmenopauzale vrouwen met en zonder borstkanker. Hiervoor vergeleken we het aantal bacteriesoorten, de bacteriële biodiversiteit en de algehele samenstelling van de darmmicrobiota van 81 postmenopauzale ER+ en HER2- borstkankerpatiënten en 67 postmenopauzale vrouwen zonder borstkanker. De vrouwen zonder borstkanker werden geïncubeerd in samenwerking met het bevolkingsonderzoek naar borstkanker nadat het mammogram geen aanwijzingen voor borstkanker liet zien. Patiënten die gepland stonden voor (neo)adjuvante (chemo)therapie bestaande uit AC-D of endocriene therapie (tamoxifen) verzamelden een ontlastingsmonster en vulde een vragenlijst in voorafgaand aan de behandeling. In totaal werden er 148 ontlastingsmonsters geanalyseerd. De darmmicrobiota werd geanalyseerd door middel van



amplicon sequencing van de 16S rRNA V4 hypervariable gen-regio. Het aantal bacteriesoorten, de bacteriële biodiversiteit en de algehele bacteriesamenstelling waren niet significant verschillend tussen borstkankerpatiënten en gezonde controles. Er was wel een significant verschil in de algehele bacteriesamenstelling tussen patiënten die een recente borstoperatie hadden ondergaan, patiënten zonder recente borstoperatie en gezonde controles zowel op het niveau van bacteriële fyla ( $p=0.042$ ) als geslacht niveau ( $p=0.015$ ). De relatieve hoeveelheden van *Dialister* en zijn bijbehorende familie Veillonellaceae ( $p=0.001$ ) waren hoger bij patiënten die recent een borstoperatie hadden ondergaan in vergelijking tot patiënten zonder recente borstoperatie. Deze hogere aantallen waren niet geassocieerd met intraveneuze profylactische antibiotica toediening met cefazoline. Wij concludeerden dat het aantal bacteriesoorten, de bacteriële biodiversiteit en de algehele bacteriesamenstelling niet geassocieerd waren met postmenopauzale borstkanker. Deze studie liet wel zien dat de aantallen van *Dialister* en Veillonellaceae toegenomen waren bij patiënten die recent een borstoperatie hadden ondergaan en dit was onafhankelijk van intraveneuze profylactische cefazoline toediening voorafgaand aan de borstoperatie. Dit suggereert dat er potentiële antibiotica onafhankelijke darmbacterie modulerende effecten zijn van een recente borstkanker operatie.

Tot slot wordt in **hoofdstuk 7** een literatuuronderzoek gepresenteerd naar de potentiële rol van de borstmicrobiota als biomarker voor borstkanker en respons op de systemische behandeling van borstkanker. Het is bekend dat borstkankerweefsel een eigen unieke microbiota bevat. Preklinische onderzoeken veronderstellen dat dysbiose van de borstmicrobiota kan bijdragen aan de initiatie en progressie van borstkanker. Daarnaast hebben preklinische studies aangetoond dat de borstmicrobiota een veelbelovende biomarker kan zijn bij het voorspellen van de prognose en het selecteren van een optimaal behandelplan. Er zijn verschillen gevonden in de samenstelling van de borstmicrobiota tussen patiënten met verschillende borstkanker subtypes en verschillende stadia die mogelijk bij kunnen dragen aan het onderdrukken van het immuunsysteem, met als gevolg dat tumorcellen vernietiging door het immuunsysteem kunnen ontwijken. Ook wordt er verondersteld dat er een interactie is tussen de borstmicrobiota, de darmmicrobiota en het immuun systeem. Al deze factoren vormen potentiële aanknopingspunten om de werkzaamheid van de systemische kankerbehandeling te optimaliseren. Om de morbiditeit ten gevolge van kanker te verminderen is het belangrijk om toekomstig onderzoek te richten op het identificeren van samenstellingen van zowel de borstmicrobiota als darmmicrobiota die geassocieerd zijn met een gunstige reactie op systemische kankertherapie.