

Renal cell carcinoma : risk factors and von Hippel-Lindau gene mutations

Citation for published version (APA):

van Dijk, B. A. C. (2006). *Renal cell carcinoma : risk factors and von Hippel-Lindau gene mutations*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20060217bd>

Document status and date:

Published: 01/01/2006

DOI:

[10.26481/dis.20060217bd](https://doi.org/10.26481/dis.20060217bd)

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

Kidney cancer is the ninth most common cancer in the European Union. Incidence and mortality rates are higher in developed regions and are approximately twice as high for men as for women. The 5-year survival is approximately 55%. Kidney cancer includes cancer of the renal parenchyma (renal cell carcinoma (RCC)) and cancer of the renal pelvis. These types of cancer differ with respect to anatomical location, type of cell from which these evolve (parenchymal cells versus urothelial cells, respectively) and their association with risk factors.

We confined our research to cancer of the renal parenchyma, RCC, which can be subdivided into several histological types. The most common histological subtype is clear-cell or conventional RCC, which accounts for approximately 75% of renal neoplasms in surgical series.

Aberrations in the *von Hippel-Lindau (VHL)* gene have been shown to be a common, early and distinct event in the development of clear-cell RCC. The *VHL* gene is a tumor suppressor gene, located on the short arm of chromosome 3 (3p25-26), and it is composed of three exons. Since the *VHL* gene is a tumor suppressor gene, both alleles need to be affected before the function will be lost. Biallelic *VHL* gene defects are observed in approximately 75% of sporadic clear-cell RCC. The human *VHL* gene encodes two VHL proteins: pVHL30 and pVHL19. Both proteins suppress tumor formation. Loss of pVHL creates an environment favorable for tumor growth.

The association of many risk factors with RCC risk has been investigated, but only cigarette smoking, obesity, a history of hypertension and use of diuretics were consistently linked to RCC risk. Although consistent, risks were not very high.

Generally, little attention is spent on the endpoint. However, RCC is a heterogeneous endpoint, i.e. there are several histological subtypes and sporadic mutations may be present or absent. Stratified analyses based on histology and the mutational status of a tumor may lead to additional insight in the carcinogenesis process.

In this thesis we investigated several hypotheses on the association between risk factors and the risk of RCC and in some instances with clear-cell RCC and the presence of mutations in the *VHL* gene within the setting of the Netherlands Cohort Study on diet and cancer (NLCS). The NLCS is a prospective cohort study, which started in September 1986. The cohort included 120,852 men and women, aged 55-69 years at the beginning of the study. All participants completed a self-administered questionnaire on dietary habits (food-frequency questionnaire), lifestyle, personal medical history, family history of cancer and demographic data. The study was designed as a case-cohort study, using all cases, while the person-time accumulated in the entire cohort was estimated using a random sample of 5,000 men and women (subcohort). Follow-up for incident cancer has been established by annual record linkage to the Netherlands cancer registry and PALGA, a national database of pathology records. After 11.3 years of follow-up, 337 incident histologically confirmed epithelial cancer cases were observed.

In chapter 2, we found BMI to be an independent risk factor for RCC (rate ratio (RR): 1.07; 95% CI: 1.02-1.12 per 1 kg/m² increment). A RR higher than 1 means that there

is an association with an increased risk (lower than 1: reduction of risk); the observed association is unlikely to be a chance result if the 95% CI does not include 1). Height in women (RR: 1.23; 95%CI: 1.02-1.46 per 5 cm increment) but not in men (RR: 0.97; 95% CI: 0.84-1.13 per 5 cm increment), and weight both in men (RR: 1.09; 95% CI: 0.98-1.20 per 5 kg increment) and women (RR: 1.11; 95% CI: 1.01-1.23 per 5 kg increment), also increased RCC risk. BMI gain since age 20 years increased the risk of RCC (RR: 1.06; 95% CI: 1.01-1.10). Energy intake was not associated with RCC, while the association of physical activity and RCC remains unclear. Furthermore, energy intake and physical activity did not explain the association of BMI and RCC.

We also observed that neither total vegetable and fruit consumption, nor the consumption of specific botanical groups of vegetables or fruits nor individual vegetables or fruits consumption were associated with a decreased RCC risk. Furthermore, there were no indications for a modifying effect by cigarette smoking, BMI or a history of hypertension (chapter 3).

To be able to investigate risk factors with the more specific endpoint of the presence of *von Hippel-Lindau (VHL)* gene mutations, we collected paraffin embedded tumor material from the large series of incident RCC cases in this cohort from 51 pathology laboratories, which has been described in chapter 4. Approval was obtained from the medical ethical committees of Maastricht University, PALGA, and the Netherlands cancer registry. We were able to identify the location of paraffin material for 273 cases out of the 337 incident cases. For 251 of 273 cases we collected paraffin blocks. After revision by a pathologist, tumor DNA from 235 cases was available for further analysis.

We observed at least one *VHL* gene mutation in 61% of the clear-cell RCC tumors; most were truncating mutations. No differences were observed in nuclear grade, TNM distribution or stage for tumors with or without a *VHL* gene mutation. *VHL* mutated tumors were on average 72.7 mm in size compared to a mean tumor size of 65.3 mm for wildtype *VHL* tumors. However, this difference was not statistically significant (chapter 4).

Cigarette smoking is a known risk factor for RCC. Cigarette smoke metabolites have been shown to cause mutations in human DNA, which is not restricted to tissues directly exposed to tobacco smoke. In chapter 5 we investigated the association of cigarette smoking to RCC and to *VHL* gene mutations in clear-cell RCC. For men, RRs for total RCC were 1.52 (95% CI: 0.89-2.59) and 2.07 (95% CI: 1.20-3.56) for ex- and current smokers compared to never smokers, respectively. Estimates for women equaled 0.95 (95% CI: 0.57-1.59) and 1.37 (95% CI 0.87-2.16), respectively. When stratified for *VHL* mutation status, RRs for current smokers compared to never smokers were 2.34 (95% CI: 0.79-6.94) and 2.95 (95% CI: 0.65-13.28) for *VHL* gene mutated and *VHL* wildtype tumors, respectively, for men. For women, these estimates were 0.82 (95% CI: 0.35-1.93) and 2.04 (95% CI: 0.94-4.45), respectively. Cigarette smoking was associated with RCC risk in men, but cigarette smoking was not specifically associated with *VHL* gene mutations, irrespective of sex. These results suggest that smoking may be associated with RCC risk, independent of *VHL* gene mutations.

A history of hypertension and use of antihypertensive medication have been associated to RCC risk, although, it remains unclear whether the increased risk is caused by hypertension or the medication. Hypertension (RR: 1.22; 95% CI: 0.94-1.58) and use of antihypertensive medication (RR: 1.14; 95% CI: 0.85-1.52) were associated with a slightly increased overall RCC risk in our study (chapter 6). A history of hypertension was associated with a non-significantly increased risk of clear-cell RCC with *VHL* gene mutations: (RR: 1.34; 95% CI: 0.87-2.07), and was not associated with the risk of clear-cell RCC without *VHL* gene mutations (RR: 0.88; 95% CI: 0.51-1.53). Use of diuretics (a type of antihypertensive) was not associated with *VHL* gene mutated clear-cell RCC (RR: 0.91; 95% CI: 0.45-1.81), but it was associated with clear-cell RCC without *VHL* gene mutations (RR: 2.11; 95% CI: 1.16-3.83). These results imply the possibility of different pathways for a history of hypertension and diuretic use, although false-positive findings as a result of multiple testing and small numbers cannot be excluded.

Dietary carotenoid and vitamin intake were not (inversely) associated with overall RCC risk (chapter 7). Supplemental vitamin E, AD and multivitamin use were associated with a non-statistically significantly increased risk. Results were suggestive of higher RRs for wildtype *VHL* tumors with alpha-carotene, beta-cryptoxanthin, folate and supplemental vitamin C and multivitamin intake.

Overall, in this study, we confirmed the positive association of BMI, cigarette smoking, a history of hypertension and antihypertensive medication use with RCC risk. We observed no association with vegetable and fruit consumption and carotenoid and vitamin intakes. We did not observe clear differential results between risk factors and the presence of *VHL* gene mutations, even though *VHL* gene mutations are an early, common and distinct feature of clear-cell RCC. One possible explanation may be that risk factors play a role in the promotion and not the initiation phase of renal carcinogenesis. Hypermethylation of the promoter area of the *VHL* gene may also render the *VHL* gene transcriptionally inactive, which should be further investigated. Furthermore, only about 60% of clear-cell RCC cases present with a *VHL* gene mutation. This indicates that there are other genes or mechanisms that have to play a role in clear-cell carcinogenesis, possibly similar to colon cancer, in which biallelic loss of function of several tumor suppressor genes and gain of function of one or more oncogenes is required.

Future research should investigate more risk factors and/or combine risk factors according to possible mechanisms. The associations investigated in this thesis should, however, be tested in other large studies. Pooling of our results with information on risk factors and *VHL* gene mutations from other studies may lead to more firm conclusions. Finally, other genes, such as genes involved in the angiogenesis pathway, genes that play a role in repair processes, or genes involved in apoptosis should also be considered for investigation in a molecular-epidemiological approach if there are reports on mutations or promoter hypermethylation in RCC.

Samenvatting

Nierkanker is het negende meest voorkomende type kanker in de Europese Unie. Incidentie en mortaliteitsratio's zijn hoger in de ontwikkelde landen en zijn ongeveer 2 keer zo hoog voor mannen dan vrouwen. De 5-jaarsoverleving bedraagt ongeveer 55%. Vaak wordt onder nierkanker niet alleen kanker van het nierparenchym, maar ook kanker van het nierbekken gerekend, maar kanker van het nierbekken is anders wat betreft anatomische locatie, het type cel waaruit de kanker zich ontwikkelt (urotheel cellen versus parenchym cellen) en de beschreven associaties met risicofactoren.

We hebben ons in ons onderzoek beperkt tot kanker van het parenchym, in het vervolg met nierkanker aangeduid, dat verder onderverdeeld kan worden in verschillende histologische subtypes. Het meest voorkomende histologisch subtype is heldercellige nierkanker, wat in ongeveer 75% van niertumoren in chirurgische series vastgesteld wordt.

Afwijkingen in het *von Hippel-Lindau (VHL)* gen zijn een vroege, veel voorkomende en karakteristieke gebeurtenis in de ontwikkeling van heldercellige niertumoren. Het *VHL* gen is een tumor suppressor gen, dat zich bevindt op de korte arm van chromosoom 3 (3p25-26), en omvat 3 exonen. In het geval van een tumor suppressor gen moeten beide allelen aangedaan zijn voordat de functie verloren gaat. Dit wordt gevonden in ongeveer 75% van de sporadische (niet erfelijke) heldercellige niertumoren. Mutaties leiden meestal tot een verkort, inactief eiwit. Het wildtype *VHL* gen kan twee eiwitten opleveren: pVHL30 en pVHL19. Beide eiwitten onderdrukken tumorgroei. Verlies van pVHL zorgt voor een omgeving die gunstig is voor tumorgroei.

De associatie tussen verschillende risicofactoren en het risico van nierkanker is al eerder onderzocht, maar alleen roken, overgewicht, hoge bloeddruk in de voorgeschiedenis en het gebruik van diuretica (medicijnen die voorgeschreven worden om de hoge bloeddruk te verlagen) werden consistent in verband gebracht met het risico van nierkanker. De gerapporteerde de risico's waren echter niet heel hoog.

Vaak wordt in epidemiologische analyses weinig aandacht geschonken aan de specificiteit van het eindpunt. Nierkanker is echter een heteroog eindpunt omdat er verschillende histologische subtypen zijn, welke gekarakteriseerd kunnen zijn door de aan- of afwezigheid van specifieke mutaties. Gestratificeerde analyses gebaseerd op histologie en op de mutatie status van een tumor kunnen leiden tot nieuwe inzichten in het ontstaansproces van nierkanker.

In dit proefschrift hebben we verschillende hypothesen betreffende het verband van risicofactoren en de kans op nierkanker onderzocht. Indien gegevens ten aanzien van de aanwezigheid van mutaties in het *VHL* gen in heldercellige niertumoren op dat moment bekend waren, dan zijn deze ook geanalyseerd als een specifiek eindpunt. Dit onderzoek is uitgevoerd binnen de Nederlandse cohort studie naar voeding en kanker (NLCS). De NLCS is een prospectieve cohort studie, welke in september 1986 gestart is. In deze cohort studie zijn 120,852 mannen en vrouwen geïnccludeerd die op dat moment 55-69 jaar oud waren. Alle deelnemers hebben een vragenlijst over voedingsgewoonten (voedselfrequentie vragenlijst), leefstijlfactoren, persoonlijke

medische geschiedenis, vragen over het voorkomen van kanker in de familie en demografische gegevens ingevuld. Het onderzoek is een zogenaamde case-cohort studie, waarin alle cases worden opgenomen die in het complete cohort ontstaan, terwijl de persoonstijd in het volledige cohort geschat wordt aan de hand van de opgebouwde persoonstijd in het subcohort (willekeurige steekproef) van 5,000 mannen en vrouwen. Incidente kanker werd vastgesteld door een jaarlijkse koppeling met de Nederlandse kankerregistratie en PALGA, een landelijke database van pathologie rapporten. Na 11.3 jaar waren er 337 incidente, histologisch bevestigde, epitheliale kanker.

In hoofdstuk 2 beschrijven we dat body mass index (BMI: gewicht in kilogram / lengte in meter²) een onafhankelijke risicofactor is voor nierkanker (risico ratio (RR): 1.07; 95% betrouwbaarheidsinterval (BI): 1.02-1.12 per 1 kg/m² toename). Een RR groter dan 1 betekent dat er een verhoging van het risico is (kleiner dan 1: verlaging van het risico); indien het getal 1 niet binnen het 95% BI valt is het onwaarschijnlijk dat de gevonden associatie door toeval kan worden verklaard. Lengte voor vrouwen (RR: 1.23; 95% BI: 1.02-1.46 per 5 cm toename), maar niet voor mannen (RR: 0.97; 95% BI: 0.84-1.13 per 5 cm toename) en gewicht in mannen (RR: 1.09; 95% BI: 0.98-1.20 per 5 kg toename) en vrouwen (RR: 1.11; 95% BI: 1.01-1.23 per 5 kg toename) verhoogden het risico van nierkanker. Ook een toename in body mass index sinds 20-jarige leeftijd verhoogde de kans op nierkanker (RR: 1.06; 95% BI: 1.01-1.10). Energie-inname was niet geassocieerd met nierkanker, terwijl de associatie tussen fysieke activiteit en nierkanker nog onduidelijk blijft. Energie-inname en fysieke activiteit verklaarden het gevonden verband tussen BMI en nierkanker niet.

In hoofdstuk 3 hebben we gevonden dat noch de totale groente en fruitconsumptie, noch de consumptie van groenten en fruit geassocieerd in botanische subgroepen, noch de consumptie van individuele soorten groenten en fruit geassocieerd waren met een verlaagd risico op nierkanker. Daarbij vonden we geen indicatie voor een modifierend effect door roken, BMI of een hoge bloeddruk in de voorgeschiedenis.

Om de associatie van risicofactoren en het specifieke eindpunt "de aanwezigheid van *von Hippel-Lindau* (*VHL*) gen mutaties" te kunnen onderzoeken, hebben we paraffine-ingebed tumormateriaal verzameld in 51 pathologielaboratoria. Dit is beschreven in hoofdstuk 4. Hiervoor hadden we toestemming van de medisch ethische commissies van de Universiteit Maastricht, PALGA en de Nederlandse Kankerregistratie verkregen. We waren in staat de locatie van het paraffine materiaal te achterhalen voor 273 van de 337 cases. Van 251 patiënten konden we ook daadwerkelijk paraffineblokkjes verzamelen. Na revisie door één patholoog, bleek dat het tumormateriaal van 235 cases beschikbaar was voor verdere analyse.

Gebruik makend van PCR-SSCP gevolgd door directe sequencing, vonden we in 61% van de heldercellige niertumoren *VHL* gen mutaties; de meeste mutaties waren truncerende mutaties. We vonden geen verschillen in nucleaire graad, TNM verdeling of stadium tussen tumoren met of zonder *VHL* gen mutaties. Tumoren met *VHL* gen mutaties waren gemiddeld 72.7 mm groot, terwijl de gemiddelde tumorgrootte van

wildtype *VHL* tumoren 65.3 mm was. Dit verschil in grootte was niet statistisch significant (hoofdstuk 4).

Roken is een bekende risicofactor voor nierkanker. Het is aangetoond dat metabolieten uit sigarettenrook mutaties veroorzaken in humaan DNA en dat dit niet alleen plaats vindt in direct blootgestelde weefsels. In hoofdstuk 5 hebben we de associatie tussen roken en nierkanker en *VHL* gen mutaties in heldercellige niertumoren onderzocht. RRs voor totaal nierkanker voor mannen waren 1.52 (95% BI: 0.89-2.59) en 2.07 (95% BI: 1.20-3.56) voor ex- en huidige rokers, respectievelijk, in vergelijking tot nooit rokers. De schattingen voor vrouwen bedroegen respectievelijk 0.95 (95% BI: 0.57-1.59) en 1.37 (95% BI: 0.87-2.16). Voor mannen waren de RRs voor huidige rokers in vergelijking tot nooit rokers respectievelijk 2.34 (95% BI: 0.79-6.94) en 2.95 (95% BI: 0.65-13.28) voor *VHL* gen gemuteerde en *VHL* wildtype tumoren. Voor vrouwen waren deze schattingen respectievelijk 0.82 (95% BI: 0.35-1.93) en 2.04 (95% BI: 0.94-4.45). Roken was geassocieerd met nierkanker bij mannen, maar niet specifiek met *VHL* gen mutaties noch bij mannen, noch bij vrouwen. Dit suggereert dat roken geassocieerd zou kunnen zijn met nierkanker, maar dat dit onafhankelijk van *VHL* gen mutaties verloopt.

Hoge bloeddruk in de voorgeschiedenis en het gebruik van medicatie tegen een hoge bloeddruk zijn gerelateerd aan de kans op nierkanker, maar het is nog onduidelijk welke van deze twee factoren het verhoogde risico veroorzaakt. Een hoge bloeddruk (RR: 1.22; 95% BI: 0.94-1.58) en het gebruik van medicatie tegen een hoge bloeddruk (RR: 1.14; 95% BI: 0.85-1.52) waren geassocieerd met een verhoogd risico op het ontwikkelen van nierkanker, maar dit was statistisch niet significant (hoofdstuk 6). Hoge bloeddruk was geassocieerd met een niet statistisch significant verhoogd risico van heldercellige niertumoren met een *VHL* gen mutatie (RR: 1.34; 95% BI: 0.87-2.07), en vertoonde geen relatie met de kans op heldercellige niertumoren zonder *VHL* gen mutaties (RR: 0.88; 95% BI: 0.51-1.53). Diureticagebruik was niet geassocieerd met *VHL* gen gemuteerde heldercellige niertumoren (RR: 0.91; 95% BI: 0.45-1.81), maar wel met heldercellige niertumoren zonder *VHL* gen mutaties (RR: 2.11; 95% BI: 1.16-3.83). Deze resultaten impliceren dat er mogelijk verschillende routes zijn, via welke hoge bloeddruk en diuretica gebruik leiden tot niertumoren, hoewel foutpositieve bevindingen als gevolg van het uitvoeren van multipele testen en kleine aantallen niet uit te sluiten zijn.

De inname van carotenoïden en vitaminen uit voeding was niet geassocieerd met niertumoren (hoofdstuk 7). Het gebruik van vitamine E, AD en multivitaminen supplementen was geassocieerd met een niet statistisch significant verhoogd risico op nierkanker. De resultaten waren suggestief voor hogere RRs in het geval van wildtype *VHL* tumoren in het geval van alfacaroteen, betacryptoxanthine, foliumzuur, vitamine C supplement en multivitaminen supplement gebruik.

Deze studie bevestigt de positieve associatie van BMI, roken, een hoge bloeddruk in de voorgeschiedenis en het gebruik van medicatie tegen een hoge bloeddruk en nierkanker. We vonden geen associatie van groente en fruit consumptie en

carotenoïden en vitamine inname en nierkanker. We vonden geen overtuigende verschillen in de associatie tussen risicofactoren en tumoren met en zonder *VHL* gen mutaties, ondanks dat *VHL* gen mutaties gezien worden als een vroege gebeurtenis in de ontwikkeling van heldercellige niertumoren. Een mogelijke reden voor deze bevindingen zou kunnen zijn dat deze risicofactoren een rol in de promotiefase en niet in de initiatiefase van de ontwikkeling van niertumoren een rol spelen. Hypermethylering van de *VHL* gen promotor zorgt er ook voor dat het gen niet afgelezen wordt en er dus geen eiwit gevormd wordt; daarom zou dit ook onderzocht moeten worden. Bovendien is het zo dat in slechts 60% van de heldercellige niertumoren *VHL* gen mutaties worden gevonden. Dit is een indicatie dat andere genen of mechanismen een rol moeten spelen in de ontwikkeling van heldercellige nierkanker, zoals ook het geval is in colorectaal tumoren, waarin verschillende tumor suppressor genen uitgeschakeld en een of meer oncogenen aangeschakeld moeten zijn. In toekomstig onderzoek zouden andere risicofactoren en/of combinaties van risicofactoren gebaseerd op mogelijke mechanismen verder onderzocht moeten worden. Ook zouden we onze resultaten graag bevestigd of ontkracht zien door andere grote studies. Resultaten uit deze studies en onze resultaten zouden dan ook samen genomen kunnen worden voor een zogenaamde gepoolde analyse, wat zou kunnen leiden tot duidelijkere conclusies. Tenslotte, zouden andere genen die betrokken zijn bij het proces van angiogenese (de vorming van nieuwe bloedvaten), genen die een rol spelen in DNA-schadeherstelprocessen en genen die een rol spelen in apoptose (geprogrammeerde celdood) ook overwogen moeten worden voor verder moleculaire-epidemiologisch onderzoek indien er aanwijzingen zijn voor mutaties of promoter hypermethylering in niertumoren.