

W. Otto¹, P.C. Rubenwolf², S. Bertz³, S. Denzinger¹, M. Burger¹, A. Hartmann³. ¹Lehrstuhl für Urologie der Universität Regensburg, ²Klinik für Urologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

26. März 2014

Potentielle Prognosemarker des frühinvasiven Harnblasenkarzinoms

Vor etwas mehr als zwei Jahren hat unsere Arbeitsgruppe an dieser Stelle in ihrem Beitrag "Prognoseparameter des frühinvasiven Harnblasenkarzinoms" die Notwendigkeit zur Gewinnung weiterer aussagekräftiger Faktoren aufgezeigt. Im Folgenden soll eine kurze Übersicht zu den wichtigsten neuen Forschungsergebnissen, die wir in den zurückliegenden Jahren erzielt haben und die sich im Wesentlichen auf die Untersuchung von Biomarkern beziehen, gegeben werden.

Ausgangslage

Das pT1 Harnblasenkarzinom gilt als das anspruchsvollste Stadium des Urothelkarzinoms. Gegenüber pTa Tumoren, die nahezu ausnahmslos erfolgreich transurethral behandelt werden können auf der einen und stets einer radikalen Zystektomie bedürftigen muskelinvasiven Tumoren auf der anderen Seite, ist das adäquate Vorgehen beim in die Lamina submucosa infiltrierenden Harnblasenkarzinom nach wie vor umstritten. Die Untersuchungsergebnisse der letzten Jahre, zu denen auch unsere Arbeitsgruppe mit Hilfe eines der größten Patientenkollektive weltweit einen Beitrag leisten konnte, haben den Begriff "oberflächliches" Harnblasenkarzinom als früheren Sammelbegriff für pTa und pT1 Harnblasentumoren folgerichtig aus der Fachliteratur verdrängt. Stattdessen gibt die Bezeichnung "frühinvasives" oder nicht muskelinvasives Harnblasenkarzinom heute einen deutlich besseren Eindruck von der klinischen Bedeutung des Harnblasenkarzinoms im Stadium pT1 wieder: immerhin bis zu einem Drittel der Patienten verstirbt an der Tumorerkrankung (1).

Bevor unsere Arbeitsgruppe dazu überging, immunhistochemisch Biomarker zu untersuchen, stand zunächst die Evaluation bereits von anderen Gruppen analysierter, klinisch-pathologischer Parameter auf dem Programm. So konnten wir etwa an 223 Patienten mit pT1G3 Harnblasenkarzinom zeigen, dass die Kombination der Parameter Tumordurchmesser > 3cm, Multifokalität und assoziiertes Carcinoma in situ (Cis) bei Blasen-erhaltend therapierten Patienten einen unabhängigen Prognoseparameter darstellt (2). Eine Reevaluation an ausschließlich Organ-erhaltend therapierten Patienten konnte dies für das begleitende Cis reproduzieren, so dass von unserer Gruppe im klinischen Alltag insbesondere für pT1 Patienten mit Cis eine frühzeitige radikale Zystektomie empfohlen wurde (3). Dieses Konzept wurde schließlich an 105 Patienten mit pT1G3 Harnblasenkarzinom geprüft: in der Tat zeigte die Patientengruppe nach initialer radikaler Zystektomie gegenüber den Patienten mit einer verzögerten Zystektomie nach vorangegangener Progression ein statistisch signifikant besseres tumorspezifisches Überleben (4).

Wir untersuchten mit einer Analyse der Bedeutung von Tumordifferenzierung auf der einen und dem Tumorinvasionsmuster auf der anderen Seite weitere histopathologische Parameter: hier gelang erstmals am frühinvasiven Harnblasenkarzinom der Nachweis eines infiltrativen Invasionsmusters als ungünstiger prognostischer Faktor für das tumorspezifische Überleben der Patienten (5). In einer aufwändigen Analyse von 310 pT1 Harnblasenkarzinom-Patienten konnte nach Reevaluation der Tumordifferenzierung durch drei Urologen nach den beiden WHO-Klassifikationen von 1973 und 2004 das etablierte dreigliedrige System als prognostisch aussagefähiger für das tumorspezifische Überleben ermittelt werden (siehe Abb. 1) (6). Eine weitere Untersuchung evaluierte die Form des pT1-Substaging und zeigte, dass Infiltration der Lamina submucosa in maximal ein Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung ein statistisch signifikant besseres tumorspezifisches Überleben bedeutete als über ein Gesichtsfeld hinaus (7). Diese Ergebnisse konnten mittlerweile auch von anderen Arbeitsgruppen nachvollzogen werden (8,9), sodass für die Zukunft weitere Untersuchungen zur Thematik geplant sind.

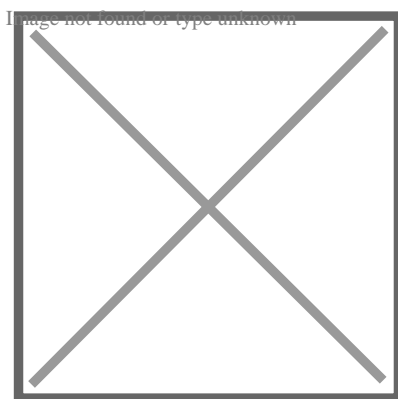


Abb. 1: Kaplan-Meier-Analysen zum tumorspezifischen Überleben von pT1 Harnblasenkarzinom-Patienten. Die WHO-Klassifikation 1973 a) konnte eine prognostisch positive und negative Gruppe diskriminieren, die Klassifikation von 2004 b) nicht.

Expression von Ki-67 und CK20 unabhängige Prognosefaktoren

Unsere Arbeitsgruppe evaluierte an einem großen Kollektiv von 309 Patienten mit pT1 Harnblasenkarzinom die prognostische Bedeutung von CK20, Ki-67 und p53 als einige der meistuntersuchten immunhistochemischen Marker beim Urothelkarzinom der Harnblase (10-14). Alle Patienten waren einer transurethralen Resektion der Blase zugeführt und im weiteren Verlauf entsprechend der Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Urologie (EAU) weiterbehandelt worden. Im Laufe des Follow-up-Zeitraums von im Median 49 Monaten (maximal 172 Monate) wurden insgesamt 25% der Patienten einer radikalen Zystektomie zugeführt. Bei 43% der Patienten war es im Verlauf zu einem Rezidiv gekommen, 20% entwickelten einen Progress hin zu muskelinvasiven Tumoren.

Anhand eines Tumor-Mikroarrays (TMA) wurden immunhistochemische Färbungen in üblicher Art und Weise von CK20, Ki-67 und p53 durchgeführt. Der Expressionsstatus wurde für alle drei Marker in 5%-Schritten semiquantitativ ermittelt und wie in vorausgegangenen Untersuchungen hinsichtlich der prognostischen Aussagefähigkeit wie folgt diskriminiert: Ki-67 $\leq 15\%$; CK20 $\leq 5\%$; p53 $< 10\%$.

In unserer Analyse war ein hoher Proliferationsindex von Ki-67 bei 64% der Patienten festzustellen. Zwar zeigte ein erhöhter Proliferationsindex (Expression >15%) keine prognostische Bedeutung für die Rezidivierung, jedoch konnte dieser mit statistisch signifikant schlechterem progressionsfreiem (77% vs. 86%, $p=0,002$) und tumorspezifischen Überleben (79% vs. 94%, $p<0,001$) verbunden werden. Für diese beiden Endpunkte konnte ein hoher Proliferationsindex von Ki-67 auch in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse als unabhängiger Prognoseparameter identifiziert werden (HR 2,80 (CI 1,45-5,43), $p=0,002$ für Progression sowie HR 3,83 (CI 1,59-9,26), $p=0,003$ für Überleben) (15).

Im Normalfall wird CK20 nur in den Superficialzellen des Urothels exprimiert, in Tumoren kann die Expression entweder ganz aufgehoben sein oder auch in tieferen Zellschichten auftreten. 18% unserer Patienten zeigten ein normales Expressionsmuster. Zwar verpasste der Marker in der Kaplan-Meier-Analyse des progressionsfreien Überlebens knapp die statistische Signifikanz, klar konnte die abnormale Expression von CK20 aber als statistisch signifikant ungünstiger Prognoseparameter für das rezidivfreie (72% vs. 96%, $p=0,001$) und das tumorspezifische Überleben (79% vs. 98%, $p=0,002$) nachgewiesen werden. Für diese Endpunkte konnte eine abnormale Expression von CK20 auch in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse als unabhängiger Prognoseparameter identifiziert werden (HR 5,89 (CI 1,44-24,15), $p=0,014$ für Rezidivierung sowie HR 8,44 (CI 1,16-61,34), $p=0,035$ für Überleben). Während Überexpression von p53 keine prognostische Bedeutung hinsichtlich Rezidivierung und Progression in unserer Untersuchung erreichte, war sie statistisch signifikant mit schlechterem tumorspezifischen Überleben (79% vs. 91%, $p=0,003$) verbunden. In keinem der drei Endpunkte konnte p53-Überexpression als unabhängiger Prognosemarker identifiziert werden.

Aus den Resultaten der immunhistochemischen Einzelanalysen von Ki-67 und CK20 wurde anschließend die Kombination der beiden aussagekräftigen Marker untersucht. Dabei zeigte die Kombination eines niedrigen Proliferationsindex von Ki-67 zusammen mit einer normalen Expression von CK20 den günstigsten Markerbefund, während ein erhöhter Proliferationsindex kombiniert mit abnormalem Expressionsmuster von CK20 mit einem statistisch signifikant schlechteren rezidivfreien, progressionsfreien und tumorspezifischen Überleben vergesellschaftet war (siehe Abb. 2) (15).

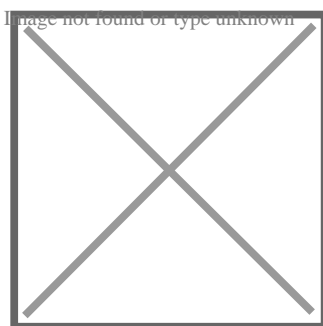


Abb. 2: Kaplan-Meier-Analysen des rezidivfreien a), progressionsfreien b) und tumorspezifischen Überlebens c) mit Feststellung einer statistisch signifikant schlechteren Prognose von Patienten mit erhöhtem Proliferationsindex von Ki-67 und abnormalem Expressionsmuster von CK20 (grüne Kurve).

Erstuntersuchung des Markers Aquaporin 3

Während die vorbeschriebenen immunhistochemischen Parameter schon von mehreren Arbeitsgruppen untersucht worden waren, kam es 2012 zur ersten Untersuchung von Aquaporin 3 (AQP3) am Harnblasenkarzinom. Bei Aquaporinen handelt es sich um ubiquitär vorkommende Transmembranproteine, die selektiv Wasser- und andere kleine Moleküle durch osmotische und hydrostatische Mechanismen die Zellmembran passieren lassen. Störungen dieser Mechanismen können wesentliche Auswirkungen auf die Zelladhäsion und die Angiogenese und damit die Karzinogenese haben (16). Lange galt das Urothel aufgrund der physiologischen Funktion der Harnblase als AQP freies Epithel. Erst eine Untersuchung von Rubenwolf et al. im Jahre 2009 bewies das Vorhandensein mehrerer der 13 Isoformen auch im Urothel. Auf molekularer Ebene wurden die Isoformen AQP 3, 4, 7 und 9 nachgewiesen und eine Bedeutung dieser Aquaporine für die Regulation der Harnosmolarität suggeriert. Auf Proteinebene war vom Urothel in der damaligen Untersuchung nur Aquaporin 3 exprimiert worden (17). Wir hatten in einer ersten Untersuchung an wenigen Urothelkarzinomen der Harnblase unterschiedlicher Stadien einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Invasivität und schlechter Differenzierung mit Expressionsverlust von AQP3 feststellen können (18).

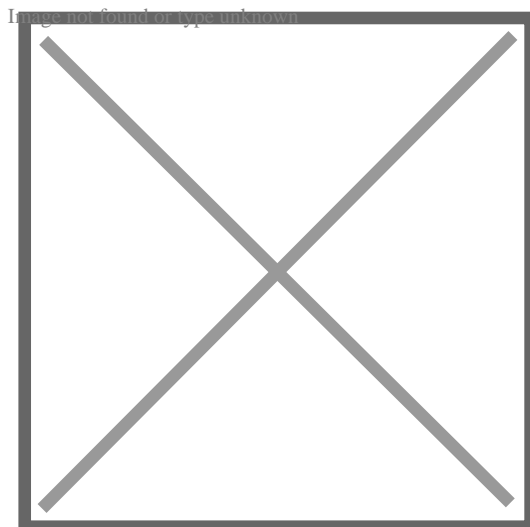


Abb. 3: Ausgeprägte membranöse Expression von Aquaporin 3 (oben) und Expressionsverlust (unten) im pT1 Harnblasenkarzinom.

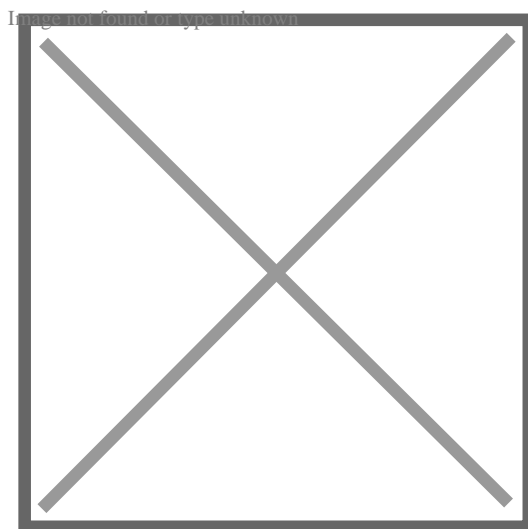
Nun wurden 87 Patienten mit pT1 Harnblasenkarzinom, die zwischen 2002 und 2009 einem Blasen-erhaltenden Regime mit transurethraler Resektion, Nachresektion und Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) Erhaltungstherapie zugeführt worden waren, in die Untersuchung eingeschlossen. Retrospektiv wurden klinische, histopathologische und Verlaufsdaten der Patienten mit einem Follow-up von im Median 31 Monaten (maximal 85 Monate) erhoben.

Von den 87 Patienten (Durchschnittsalter 70 Jahre) waren 83% männlich, 86% zeigten ein initiales pT1 Karzinom (19). Im beschriebenen Patientenkollektiv konnte die in der vorausgegangenen deskriptiven Analyse vorgefundene Expression von AQP3 beim pT1 Harnblasenkarzinom mit 59% nahezu punktgenau reproduziert werden. Das tumorspezifische Überleben nach 4 Jahren zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit AQP3 exprimierenden (79%) und nicht exprimierenden (83%) Tumoren ($p=0,762$).

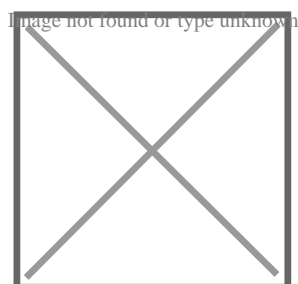
Dagegen war Verlust der Expression von AQP3 für die betreffenden Patienten mit einem schlechteren rezidiv- (22% vs. 60%) und progressionsfreien Überleben (20% vs. 72%) vergesellschaftet, was für das progressionsfreie Überleben auch statistische Signifikanz erreichte ($p=0,02$). In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse konnte Expressionsverlust von Aquaporin 3 als einziger unabhängiger Prognoseparameter (HR 7,58 (CI 1,29-44,68), $p=0,025$) verifiziert werden (siehe Tab. 1) (19).

Zusammenfassung

Neben den klassischen klinisch-pathologischen Harnblasenkarzinom-Prognoseparametern wie Tumordifferenzierung oder Fokalität, Tumorgöße und begleitendes Carcinoma in situ konnten wir insbesondere eine exzessive Invasion des Tumors über ein Gesichtsfeld hinaus unter 400facher Vergrößerung als prognostisch ungünstigen Parameter für das Stadium pT1 Urothelkarzinom nachweisen. Zusätzlich zeigten wir insbesondere, dass die Überexpression von Ki-67, die aberrante Expression von CK20 sowie der Expressionsverlust von AQP3 mit einer statistisch signifikant schlechteren Prognose assoziiert zu sein scheinen. Die routinemäßige Färbung von TURB-Material bei pT1 Harnblasenkarzinomen mit entsprechenden Biomarkern könnte frühzeitig eine Progressionsgefahr anzeigen und damit zu einer radikaleren Therapiestrategie, etwa im Sinne einer Frühzystektomie führen.



Tab.1: Multivariate Cox-
Regressionsanalyse bezüglich des
progressionsfreien Überlebens von
Patienten mit pT1 Harnblasenkarzinom.



PD Dr. med. Wolfgang Otto

Forschungskoodinator

Lehrstuhl für Urologie der Universität Regensburg

Franz-Josef-Strauß-Allee 11

93053 Regensburg

E-Mail: wolfgang.otto@ukr.de

Abstract

W. Otto¹, P.C. Rubenwolf², S. Bertz³, S. Denzinger¹, M. Burger¹, A. Hartmann³. ¹Lehrstuhl für Urologie der Universität Regensburg, ²Klinik für Urologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, ³Institut für Pathologie der Universität Erlangen-Nürnberg

Stage pT1 bladder cancer is a challenging disease associated with high risk of recurrence and progression. We propose some new prognostic markers: infiltration beyond one high power field of pT1 bladder cancer into lamina submucosa, overexpression of Ki67, aberrant CK20 and loss of AQP3 should be involved in routine assessment of stage pT1 bladder cancer.

Keywords: *bladder cancer, stage pT1, molecular markers, Ki67, CK20, AQP3, substaging*

Literaturhinweise:

- (1) Denzinger S, Burger M, Fritsche HM, et al. [Bladder preservation or initial cystectomy in T1G3 bladder cancer: which parameters help in therapeutic decision-making?]. *Aktuelle Urol.* 2008;39(1):58-61; discussion 62-3. German.
- (2) Denzinger S, Otto W, Fritsche HM, et al. Bladder sparing approach for initial T1G3 bladder cancer: Do multifocality, size of tumor or concomitant carcinoma in situ matter? A long-term analysis of 132 patients. *Int J Urol.* 2007;14(11):995-9; discussion 999.
- (3) Denzinger S, Fritsche HM, Otto W, et al. Early versus deferred cystectomy for initial high-risk pT1G3 urothelial carcinoma of the bladder: do risk factors define feasibility of bladder-sparing approach? *Eur Urol.* 2008 Jan;53(1):146-52.
- (4) Shahin O, Thalmann GN, Rentsch C, et al. A retrospective analysis of 153 patients treated with or without intravesical bacillus Calmette-Guerin for primary stage T1 grade 3 bladder cancer: recurrence, progression and survival. *J Urol.* 2003;169(1):96-100; discussion 100.
- (5) Denzinger S, Burger M, Fritsche HM, et al. Prognostic value of histopathological tumour growth patterns at the invasion front of T1G3 urothelial carcinoma of the bladder. *Scand J Urol Nephrol.* 2009;43(4):282-7.
- (6) Otto W, Denzinger S, Fritsche HM, et al. The WHO classification of 1973 is more suitable than the WHO classification of 2004 for predicting survival in pT1 urothelial bladder cancer. *BJU Int.* 2011;107(3):404-8.
- (7) Bertz S, Denzinger S, Otto W, et al. Substaging by estimating the size of invasive tumour can improve risk

stratification in pT1 urothelial bladder cancer-evaluation of a large hospital-based single-centre series.

Histopathology. 2011;59(4):722-32.

(8) van Rhijn BWG, van der Kwast TH, Alkhateeb SS, et al. A New and Highly Prognostic System to Discern T1 Bladder Cancer Substage. *Eur Urol*. 2012;378-384.

(9) Chang WC, Chang YH, Pan CC. Prognostic Significance in Substaging of T1 Urinary Bladder Urothelial Carcinoma on Transurethral Resection. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(3):454-61.

(10) Harnden P, Mahmood N, Southgate J. Expression of cytokeratin 20 redefines urothelial papillomas of the bladder. *Lancet*. 1999;353(9157):974-7.

(11) Southgate J, Harnden P, Trejdosiewicz LK. Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications. *Histol Histopathol*. 1999;14(2):657-64.

(12) Desai S, Lim SD, Jimenez RE, et al. Relationship of cytokeratin 20 and CD44 protein expression with WHO/ISUP grade in pTa and pT1 papillary urothelial neoplasia. *Mod Pathol*. 2000;13(12):1315-23.

(13) Wolf HK, Stöber C, Hohenfellner R, Leissner J. Prognostic value of p53, p21/WAF1, Bcl-2, Bax, Bak and Ki-67 immunoreactivity in pT1 G3 urothelial bladder carcinomas. *Tumour Biol*. 2001;22(5):328-36.

(14) Gonzalez-Campora R, Davalos-Casanova G, Beato-Moreno A, et al. BCL-2, TP53 and BAX protein expression in superficial urothelial bladder carcinoma. *Cancer Lett*. 2007;250(2):292-9.

(15) Bertz S, Otto W, Denzinger S, et al. Combination of CK20 and Ki-67 Immunostaining Analysis Predicts Recurrence, Progression, and Cancer-Specific Survival in pT1 Urothelial Bladder Cancer. *Eur Urol*. 2014;65(1):218-26.

(16) Saadoun S, Papadopoulos MC, Hara-Chikuma M, Verkman AS. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature* 2005;434:786-92.

(17) Rubenwolf PC, Georgopoulos NT, Clements LA, et al. Expression and localisation of aquaporin water channels in human urothelium in situ and in vitro. *Eur Urol*. 2009;56:1013-24.

(18) Rubenwolf PC, Denzinger S, Otto W. Aquaporin 3 protein expression in transitional cell carcinoma: a potential marker with regard to tumour progression and prognosis? *Eur Urol*. 2012;61(3):627-8.

(19) Otto W, Rubenwolf PC, Burger M, et al. Loss of aquaporin 3 protein expression constitutes an independent prognostic factor for progression-free survival: an immunohistochemical study on stage pT1 urothelial bladder cancer. *BMC Cancer*. 2012;12(1):459.