

Validatie van een nieuwe urinetest voor klinisch significante prostaatkanker

Rianne J. Hendriks, Siebren Dijkstra, Erik B. Cornel, Sander A. Jannink, Hans de Jong, Daphne Hessels, Frank P. Smit, et al.

Tijdschrift voor Urologie

ISSN 2211-3037

Volume 6

Combined 2-3

Tijdschr Urol (2016) 6:34-43

DOI 10.1007/s13629-015-0113-0



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Bohn Stafleu van Loghum. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Validatie van een nieuwe urinetest voor klinisch significante prostaat­kanker

Rianne J. Hendriks¹ · Siebren Dijkstra¹ · Erik B. Cornel² · Sander A. Jannink³ · Hans de Jong³ · Daphne Hessels³ · Frank P. Smit³ · Willem J.G. Melchers^{1,3} · Gisèle Leyten¹ · Theo M. de Reijke⁴ · Henk Vergunst⁵ · Paul Kil⁶ · Ben C. Knipscheer⁷ · Christina A. Hulsbergen-van de Kaa⁸ · Peter F.A. Mulders¹ · Inge M. van Oort¹ · Jack A. Schalken^{1,3}

Published online: 26 February 2016
© Bohn Stafleu van Loghum 2016

Samenvatting Om overdiagnostiek en overbehandeling te verminderen, is er dringend behoefte aan een test voor detectie van klinisch significant prostaatacarcinoom. In deze studie werd een model ontwikkeld (met behulp van geïdentificeerde biomarkers HOXC6, DLX1, TDRD1 en HOXC4) voor het voorspellen van hooggradig prostaatacarcinoom in prostaatbipten. In twee prospectieve, multicenterstudies (cohort A: $n=492$; cohort B: $n=371$) werd urine verzameld voorafgaand aan prostaatbipten. De resultaten van cohort A werden gebruikt voor het model en gevalideerd in het onafhankelijke cohort B. De HOXC6-DLX1-score had de hoogste *area under the curve* (0,76; 95%-betrouwbaarheid-sinterval (BI)=0,71–0,81), met een specificiteit van 36% bij een sensitiviteit van 92%. De score was gecorreleerd met de Gleason-score van de prostaatbipten; subgroepanalyse bevestigde de potentiële meerwaarde van deze urinetest voor patiënten met lage PSA-waarden (<10 ng/ml).

De conclusie is dat de HOXC6-DLX1-score het risico op hooggradig prostaatacarcinoom in prostaatbipten voorspelt. Het gebruik van deze urinetest kan het aantal onnodige bipten reduceren, vooral bij patiënten met een lage PSA-waarde.

Trefwoorden prostaat­kanker · urinetest · hooggradig

Rianne J. Hendriks en Siebren Dijkstra hebben evenveel bijgedragen aan dit artikel.

✉ prof. dr. Jack A. Schalken
jack.schalken@radboudumc.nl

- 1 afdeling Urologie, Radboudumc, Nijmegen, Nederland
- 2 afdeling Urologie, Ziekenhuisgroep Twente, Hengelo, Nederland
- 3 Research and Development, Novio­gendix, Nijmegen, Nederland
- 4 afdeling Urologie, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam, Nederland

Validation of a new urine test for clinically significant prostate cancer

Abstract To reduce overdiagnosis and overtreatment there is an urgent need for a test to detect clinically significant prostate cancer (PCa). In this study a model was developed (using the identified biomarkers HOXC6, DLX1, TDRD1 and HOXC4) for the prediction of high-grade PCa upon prostate biopsy. In two prospective, multicenter studies (cohort A: $n=492$; cohort B: $n=371$) urine was collected prior to prostate biopsies. Results from cohort A were used to develop a model and validated in the independent cohort B. The HOXC6-DLX1 score resulted in the highest area under the curve of 0.76 (95%CI: 0.71–0.81), with 36% specificity and 91% sensitivity. The score was positively correlated with Gleason score. Subgroup analysis confirmed the value for patients with low PSA levels (<10 ng/ml). The HOXC6-DLX1 score predicts the risk of high-grade PCa upon prostate biopsy. Using this urine test could reduce the amount of unnecessary biopsies, particularly in patients with low serum PSA levels.

Keywords prostate cancer · urine test · high-grade

- 5 afdeling Urologie, Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen, Nederland
- 6 afdeling Urologie, St Elisabeth Ziekenhuis, Tilburg, Nederland
- 7 afdeling Urologie, Scheper Ziekenhuis, Emmen, Nederland
- 8 afdeling Pathologie, Radboudumc, Nijmegen, Nederland



Introductie

Prostaatcarcinoom is de meest voorkomende vorm van kanker onder Nederlandse mannen. Het prostaatcarcinoom heeft in Nederland een (ruw geschatte) incidentie van ongeveer 131 op de 100.000 mannen per jaar (Nederlandse Kankerregistratie 2013; www.cijfersoverkanker.nl).

Sinds de introductie van serum-prostaatspecifiek antigeen (sPSA) is de incidentie van prostaatkanker wereldwijd toegenomen en is een verlaging van de leeftijd en het stadium van de ziekte bij diagnose opgetreden. Het meten van sPSA heeft ook geleid tot een toename van het aantal onnodige prostaatbiopsieën en het opsporen van klinisch niet-significante (indolente) tumoren die nooit klachten zullen veroorzaken of levensbedreigend zullen worden (potentiële overbehandeling). Dit is voornamelijk het geval in de 'grijze zone' van sPSA (4,0–10,0 ng/ml) waarin 65–70% van de mannen uiteindelijk een negatief prostaatbiopt blijkt te hebben [1]. Bij mannen met een indolent prostaatcarcinoom die behandeling ondergaan, is er kans op complicaties (zoals urine-incontinentie en impotentie), zonder dat het risico op overlijden aan prostaatkanker wordt gereduceerd [2]. Albertsen et al. hebben laten zien dat mannen met een hooggradig prostaatcarcinoom een grote kans hebben om binnen tien jaar te overlijden aan de gevolgen van deze ziekte, terwijl dit risico bij mannen met een laaggradig prostaatcarcinoom minimaal is [3].

De uitdaging bij prostaatkankerdiagnostiek ligt vooral in het verbeteren van de detectie van klinisch-significant (of hooggradig) prostaatcarcinoom. Zowel overdiagnostiek als overbehandeling kan worden gereduceerd indien prostaatcarcinoom-specifieke merkstoffen (biomarkers) worden toegepast, die onderscheid kunnen maken tussen indolente en agressieve tumoren.

Op dit moment heeft veel onderzoek zich gericht op het identificeren van nieuwe biomarkers. Biomarkers die afkomstig zijn uit de prostaat kunnen in de urine gemeten worden. De hoeveelheid (tumor)cellen die op deze manier uitgescheiden wordt, wordt vergroot door het uitvoeren van een rectaal toucher (prostaatmassage) [4]. De PCA3-urinetest (Progensis[®] PCA3, Gen-Probe) is de enige moleculaire urinetest voor de detectie van prostaatcarcinoom die is goedgekeurd door de Amerikaanse *Food and Drug Administration* (FDA) [5]. PCA3 werd ontdekt als een gen dat codeert voor een lang *non-coding* RNA en komt tot overexpressie in prostaatcarcinoom [6, 7]. PCA3 heeft aantoonbaar toegevoegde waarde voor de detectie van prostaatcarcinoom, maar de relatie met tumoragressiviteit en de hiermee samenhangende prognostische waarde blijven controversieel [8–10].

Een *unmet clinical need* is dat er geen biomarkers zijn die de aanwezigheid van met name hooggradig prostaatcarcinoom kunnen voorspellen en kunnen bijdragen aan de

besluitvorming ten aanzien van verdere diagnostiek (prostaatbiopsien of beeldvorming) of behandeling.

In een eerdere studie beschreven Leyten et al. een stapsgewijze benadering voor het identificeren en selecteren van nieuwe biomarkers in urinesedimenten [11]. Een genenpaneel werd geselecteerd voor het voorspellen van hooggradig prostaatcarcinoom (Gleason-score ≥ 7) bij prostaatbiopsie. De test, die is gebaseerd op *Homeobox C6* (HOXC6), *Distal-less Homeobox 1* (DLX1) en *Tudor domain containing 1* (TDRD1), had een onafhankelijke toegevoegde waarde ten opzichte van sPSA voor het voorspellen van hooggradig prostaatcarcinoom. De combinatie van deze drie genen was superieur aan de Progensis[®] PCA3-test [11]. HOXC6, DLX1 en TDRD1 zijn opgereguleerd in prostaatcarcinoom en zijn mogelijk betrokken bij het ontstaan van prostaatcarcinoom. Daarnaast zijn deze genen geassocieerd met hooggradig prostaatcarcinoom [11]. In deze studie hebben we, naast deze drie markers, ook *Homeobox C4* (HOXC4) toegevoegd. HOXC4 is afkomstig van dezelfde transcriptie-unit als HOXC6 en tevens veelbelovend.

Het doel van deze studie was validatie van de urinetest die op het genenpaneel was gebaseerd en daarnaast het ontwikkelen van een model (met biomarkers HOXC6, DLX1, TDRD1 en HOXC4) dat gebruikt kan worden bij het voorspellen van hooggradig prostaatcarcinoom in prostaatbiopsien. Dit voorspellende model werd klinisch gevalideerd in een onafhankelijk cohort.

Materiaal

Studiepopulatie

In de twee prospectieve multicenterstudies zijn mannen geïncludeerd met een verhoogde sPSA-waarde ($>3,0$ ng/ml), een afwijkend rectaal toucher en/of een belaste familieanamnese, die een prostaatbiopsie ondergingen. Urine werd verzameld nadat een gestandaardiseerd rectaal toucher was uitgevoerd [4]. Exclusiecriteria waren: reeds bekend met prostaatcarcinoom, gebruik van medicatie met een bekend effect op de sPSA-waarde, eerdere prostaatbiopsien (<3 maanden voor deelname) en een invasieve behandeling voor benigne prostaathyperplasie (BPH) (<6 maanden voor deelname). TRUS-geleide prostaatbiopsieën (mediaan 10 biopsien) werden uitgevoerd en beoordeeld volgens het lokale protocol.

De patiënten werden geïncludeerd in zes ziekenhuizen in Nederland, tussen september 2009 en juli 2011 (cohort A) en tussen juli 2011 en september 2014 (cohort B). Deelnemende patiënten hebben schriftelijk *informed consent* gegeven. De studieprotocollen zijn goedgekeurd door de medisch-ethische commissies van alle deelnemende centra. De studieresultaten zijn niet bekend gemaakt aan de patiën-



ten en urologen, aangezien aan de resultaten geen klinische consequenties verbonden konden worden. De analisten die de biomarkeranalyses hebben uitgevoerd, waren geblindeerd voor de klinische gegevens.

Urine afname en verwerking

Direct na het rectaal toucher werd ongeveer 30 ml uitgeplaste urine (*first-void*) opgevangen. De urine werd vervolgens direct overgebracht in een transportbuis met fixatievloeistof (Gen-Probe, Hologic). De monsters werden verzonden naar een centraal laboratorium, Novioendix Research BV, en binnen zeven dagen bij -80°C opgeslagen.

Ontwikkeling van een Laboratory Developed Test (LDT)

In de studie van Leyten et al. werden urinesedimenten gebruikt voor de biomarkeranalyse [11]. In de huidige studie werd een prototype van de amplificatiekit (Labo Bio-medical Products BV, LBP) gebruikt, met de ontwikkelde *One-step reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) assay*, voor het analyseren van onbewerkte urine (*whole urine*). De test is gebaseerd op de Taqman[®] PCR-technologie, gecombineerd met absolute kwantificering van KLK3, HOXC6, DLX1, TDRD1 en HOXC4. Ook werd een test ontwikkeld voor het meten van PCA3 in onbewerkte urine, die is gebaseerd op hetzelfde principe.

Kwantificering van het RNA

Met behulp van de MagNA Pure 96 (Roche) werd geautomatiseerde nucleïnezuur-isolatie uitgevoerd. Voor de kwantificering van de genexpressie werd gebruikgemaakt van de *Abs Quant/2nd Derivative (high confidence) crossing point (Cp)* methode, die werd geïmplementeerd door de Light-Cycler[®] 480, software versie 1.5.0 (Roche). De Cp-waarde is omgekeerd gecorreleerd aan de hoeveelheid mRNA, dat wil zeggen, hoe lager de Cp-waarde, des te hoger de genexpressie die wordt gemeten in urine. De ratio's van de biomarkers werden berekend om de qPCR-resultaten te normaliseren, waarbij de Delta Delta-Cp-methode ($\Delta\Delta\text{Cp}$) werd gebruikt [12]:

$$\text{Ratio} = 2^{\left(\frac{(\text{Avg Cp}_{(\text{Cal}10^4)_{\text{target}}} - \text{Cp}_{(\text{sample})_{\text{target}}})}{-(\text{Avg Cp}_{(\text{Cal}10^4)_{\text{reference}}} - \text{Cp}_{(\text{sample})_{\text{reference}}})} \right)} \times 10.000.$$

Statistische analyse

Statistische analyses werden uitgevoerd met SPSS[®] versie 20.0. Als significantieniveau werd een tweezijdige *p*-waarde $<0,05$ gekozen. De biomarkerwaarden waren niet normaal

verdeeld; daarom werden non-parametrische statistische testen gebruikt en werden de mediaan en range aangegeven. De expressieniveaus van de biomarkers werden vergeleken met de uitkomst van de prostaatbipten. De testkarakteristieken, de *area under the curve* (AUC) van de *receiver operating characteristic* (ROC) curve en de bijbehorende 95%-betrouwbaarheidsintervallen (BI) van het gekozen model werden bepaald. *Bootstrap*analyse werd uitgevoerd als interne validatie van de modellen en om de betrouwbaarheid te toetsen voor het voorspellen van de aanwezigheid van hooggradig prostaatacarcinoom in de prostaatbipten.

Resultaten

Patiënt- en biomarkerkarakteristieken

In totaal werden 905 urinemonsters verzameld in twee onafhankelijk studies (cohort A: $n=519$; cohort B: $n=386$). Patiëntkarakteristieken zijn te vinden in tab. 1. In cohort A hadden 212 van de 519 mannen (41%) prostaatacarcinoom in de prostaatbipten, dat bij 109 (51%) hooggradig was (Gleason-score $\text{GS} \geq 7$). In cohort B was dit bij 181 van de 386 mannen (47%) het geval en in dit cohort waren 91 (50%) bipten hooggradig. Er was een statistisch significant verschil tussen de cohorten met betrekking tot het aantal patiënten dat eerder biptieën had ondergaan ($p < 0,001$), met een hoger percentage in cohort A dan in cohort B. Verder waren er geen significante verschillen tussen de twee cohorten. Alle 905 urinemonsters bevatten meetbare hoeveelheden van het prostaatspecifieke KLK3, waardoor ze representatief waren voor verdere biomarkeranalyse.

Selectie van een model voor het voorspellen van hooggradig prostaatacarcinoom bij prostaatbiptie

Voor de ontwikkeling van het model werden de 519 urinemonsters van cohort A gebruikt. Om de verschillende biomarkers met elkaar te vergelijken, werd een drempelwaarde van ca. 90% sensitiviteit gekozen voor het voorspellen van prostaatacarcinoom met $\text{GS} \geq 7$ in de prostaatbipten. De afkapwaarde, AUC, sensitiviteit, specificiteit, negatief en positief voorspellende waarde werden bepaald voor iedere biomarker (tab. 2). Van de individuele biomarkers had HOXC6 de hoogste AUC (0,73; 95%-BI = 0,68–0,79) en de hoogste specificiteit (33%) bij een sensitiviteit van 91%.

HOXC6 en HOXC4 waren sterk met elkaar gecorreleerd (Pearsons correlatiecoëfficiënt (R^2) 0,80), wat inhoudt dat deze markers elkaar niet aanvulden. Om te bepalen of DLX1 en/of TDRD1 iets toevoegden aan de prestatie van HOXC6 of HOXC4 werden modellen gemaakt op basis van ratio's. Bij gebruik van een afkapwaarde van 27,5 had de combinatie van HOXC6 met DLX1 de beste prestatie, met



Tabel 1 Patiëntkarakteristieken.

	cohort A	cohort B	
	(n=519)	(n=386)	
	mediaan (range)/n (%)	mediaan (range)/n (%)	p-waarde
leeftijd (jaren)	65 (44–86)	65 (39–84)	0,28 ^a
PSA (ng/ml)	7,4 (5,5–11,1)	7,3 (5,2–10,9)	0,29 ^a
prostaatca in familie geen eerdere bipten	91 (18 %) 410 (79 %)	74 (19 %) 342 (89 %)	0,53 ^b <0,001 ^b
TRUS prostaatvolume (cc)	48 (15–200)	45 (15–270)	0,08 ^a
prostaatca in bipten ^c	214 (41 %)	181 (47 %)	0,09 ^b
GS ≤6	103 (49 %)	90 (50 %)	
GS 7	58 (27 %)	52 (29 %)	
GS 8–10	51 (24 %)	39 (22 %)	

prostaatca prostaatcarcinoom TRUS transrectal ultrasound, GS Gleason-score

^aMann-Whitney-U-test

^bChi-kwadraattoets; significantieniveau <0,05. Dikgedrukt = statistisch significant verschil

^cVan twee deelnemers was de totale Gleason-score niet bekend, er was sprake van minimaal één Gleason-score 4-component

een sensitiviteit van 91 %, een specificiteit van 36 % en een AUC van 0,76 (95%-BI = 0,71–0,81). Het toevoegen van meer markers aan deze combinatie had geen effect (tab. 2).

Bootstrapanalyse werd gebruikt om de modellen intern te valideren. Na 100 bootstraprePLICaties verbeterden HOXC6 en DLX1 de accuratesse voor detectie van GS ≥ 7 in respectievelijk 97 % en 98 % van de gevallen. In de modellen met HOXC6 verbeterde TDRD1 de accuratesse in 38 % van de *bootstrap samples*. De modellen met HOXC6 hadden de hoogste AUC's; de hoogste AUC werd gevonden bij de combinatie HOXC6 + DLX1. Daarom is dit model, genaamd de HOXC6-DLX1-score, geselecteerd en verder gevalideerd.

Betrouwbaarheid van de uitkomsten

De KLK3-waarde is gebruikt als maat voor de aanwezigheid van voldoende prostaatkernen in de urine. Om fout-negatieve uitslagen te voorkomen, werd voor samples met een HOXC6-DLX1-score ≤27,5 als minimumwaarde 10.000 kopieën KLK3 gekozen. Als gevolg hiervan werden in cohort A 27 monsters gedefinieerd als onbetrouwbaar, waardoor 492 analyseerbare samples resteerden (95 %). In cohort B gold dit voor 15 samples, waardoor 371 informatieve samples voor analyse overbleven (96 %).

Klinische waarde van de HOXC6-DLX1-score voor het voorspellen van hooggradig prostaatcarcinoom

Om de voorspellende waarde van de HOXC6-DLX1-score te bepalen, werd een ROC-curve gegenereerd. Met hooggradig prostaatcarcinoom in de prostaatbiopsie als de klinische uitkomst, werd de HOXC6-DLX1-score vergeleken met PCA3 (fig. 1). De HOXC6-DLX1-score (AUC = 0,75; 95%-BI = 0,70–0,80) was superieur aan PCA3 (AUC = 0,65; 95%-BI = 0,59–0,71) in het voorspellen van hooggradig prostaatcarcinoom. De specificiteit van de HOXC6-DLX1-score was hoger dan die van PCA3, 32 % versus 19 %.

Externe validatie van de HOXC6-DLX1-score voor het voorspellen van hooggradig prostaatcarcinoom

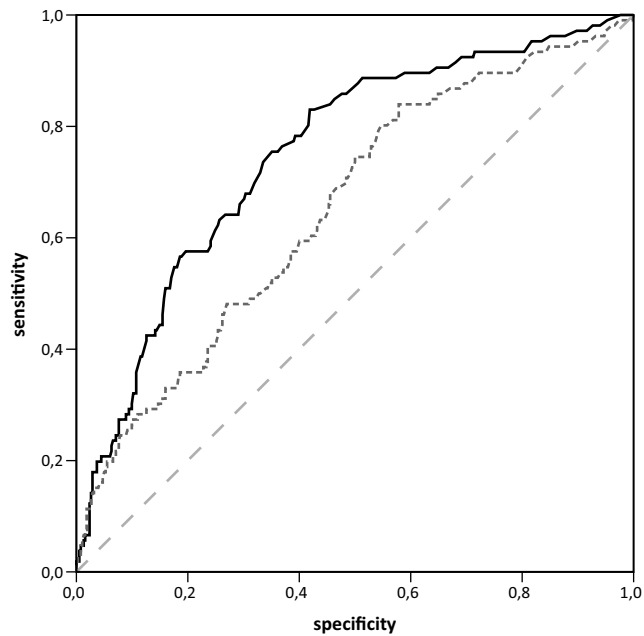
De voorspellende waarde van de HOXC6-DLX1 score werd gevalideerd met de 371 informatieve samples afkomstig van cohort B. De klinische prestaties van de HOXC6-DLX1-score in cohort B (AUC = 0,73 [95%-BI = 0,67–0,78]) waren vergelijkbaar met de prestaties in cohort A (AUC = 0,75). Daarnaast bleef de sensitiviteit 92 % bij de afkapwaarde

Tabel 2 Biomarkermodellen met vastgestelde afkapwaarden en klinische prestaties.

model	afkapwaarde	AUC	Se (%)	Sp (%)	NPV (%)	PPV (%)
PCA3	35,0	0,65	91	20	89	23
TDRD1	1,0	0,69	90	11	80	21
DLX1	0,5	0,65	83	16	79	21
HOXC4	15,5	0,64	91	22	90	23
HOXC4 + DLX1	26,5	0,70	91	31	93	25
HOXC4 + TDRD1	50,5	0,72	91	30	93	25
HOXC4 + DLX1 + TDRD1	57,5	0,73	91	31	93	26
HOXC6	19,5	0,73	91	33	93	26
HOXC6 + DLX1	27,5	0,76	91	36	94	27
HOXC6 + TDRD1	50,5	0,74	91	35	94	27
HOXC6 + DLX1 + TDRD1	55,5	0,74	91	34	93	26
HOXC6 + HOXC4 + DLX1 + TDRD1	85,5	0,74	91	33	93	26

AUC area under the curve, Se sensitiviteit, Sp specificiteit, NPV negatief voorspellende waarde, PPV positief voorspellende waarde. Dikgedrukt: de uiteindelijk gekozen combinatie





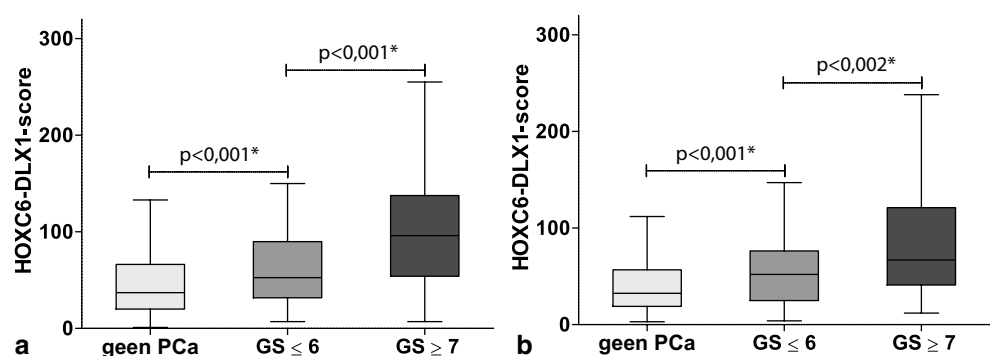
Figuur 1 De ROC-curves voor het voorspellen van hooggradig prostaatkarcinoom in prostaatbiopsies: (1) HOXC6-DLX1-score (zwarte doorlopende lijn; AUC = 0,75; 95%-BI = 0,70–0,80); (2) PCA3 (grijze stippellijn; AUC = 0,65 (95%-BI = 0,59–0,71).

van 27,5 en was de specificiteit hoger, 37% vergeleken met 32% in cohort A (tab. 3).

HOXC6-DLX1-scores in relatie tot de Gleason-score gevonden in de prostaatbiopsies

In cohort A was bij 286 mannen (58%) geen sprake van prostaatkarcinoom, bij 98 mannen (20%) werd $GS \leq 6$ in de prostaatbiopsies aangetroffen en bij 108 mannen (22%) $GS \geq 7$. In cohort B was dit bij respectievelijk 196 (53%), 86 (23%) and 89 (24%) mannen het geval. Er was een significant verband tussen de HOXC6-DLX1-score en de Gleason-score die werden gevonden in de prostaatbiopsies (fig. 2).

Figuur 2 De HOXC6-DLX1-score in relatie met de Gleason-score in cohort A (a) en cohort B (b). Mann-Whitney-U-test ($p < 0,05$)



Tabel 3 Klinische prestaties van de HOXC6-DLX1-score.

HOXC6-DLX1-score	cohort A (n=492)	cohort B (n=371)
AUC (95%-BI)	0,75 (0,70–0,80)	0,73 (0,67–0,78)
afkapwaarde	27,5	27,5
sensitiviteit	92%	92%
specificiteit	32%	37%
NPV	93%	94%
PPV	27%	32%

AUC area under the curve, NPV negatief voorspellende waarde, PPV positief voorspellende waarde

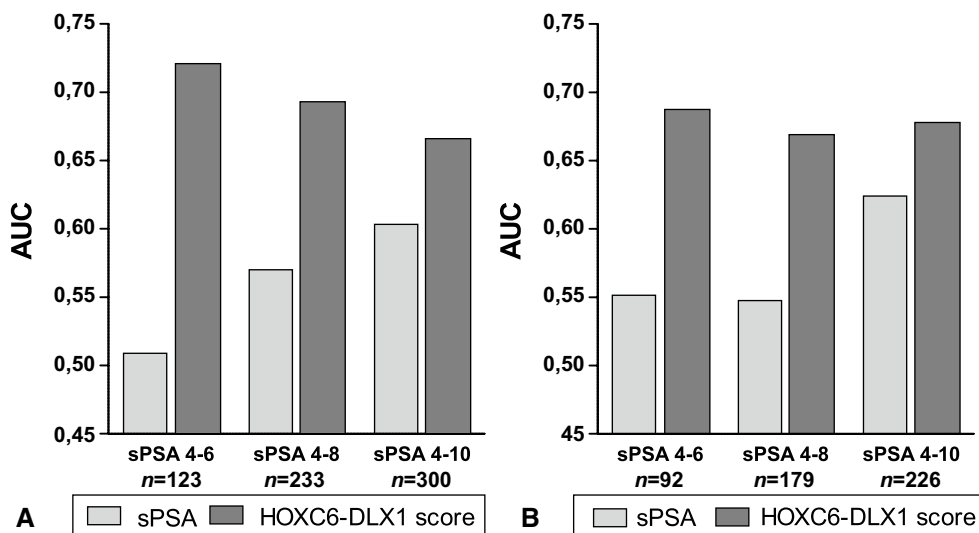
Prestaties van de HOXC6-DLX1-score in de sPSA 'grijze zone'

Om de aanvullende waarde van de HOXC6-DLX1-score te bepalen in de sPSA 'grijze zone' (4–10 ng/ml), werden sPSA-subgroepen gemaakt van 4–6 ng/ml, 4–8 ng/ml en 4–10 ng/ml. De AUC's van de HOXC6-DLX1-score voor het voorspellen van hooggradig prostaatkarcinoom werden vergeleken met de AUC's van sPSA (fig. 3). De AUC's van de HOXC6-DLX1-score varieerden van 0,68–0,71 in cohort A. De AUC van sPSA in de laagste subgroep nam af tot 0,52. In cohort B waren de AUC's van de HOXC6-DLX1-score 0,69–0,71, terwijl de AUC van sPSA afnam tot 0,55 in de laagste sPSA-groep.

Discussie

Er is veel onderzoek verricht naar nieuwe biomarkers voor het opsporen van prostaatkanker. Echter, weinig van deze biomarkers worden in de dagelijkse praktijk gebruikt. De uitdaging is om de toegevoegde waarde van de biomarkers onafhankelijk te valideren in een klinisch cohort. Leyten et al. hebben een veelbelovend genenpaneel beschreven voor het voorspellen van hooggradig prostaatkarcinoom ($GS \geq 7$) bij prostaatsbiopsie [11]. In onze prospectieve studie gebruikten we deze veelbelovende urinebiomarkers voor het maken van een voorspellend model. De HOXC6-DLX1-score had de beste voorspellende waarde voor hooggradig prostaatkarcinoom.

Figuur 3 Voorspellende waarde (AUC) van de HOXC6-DLX1-score en sPSA voor de detectie van hooggradig prostaatacarcinoom in lage sPSA-subgroepen, cohort A (a) en cohort B (b).



Vanwege de heterogeniteit van prostaatacarcinoom, is het logisch dat een combinatie van verschillende biomarkers de nauwkeurigheid van een test verhoogt [13, 14]. Het toevoegen van meer markers aan het HOXC6-DLX1-model zorgde echter niet voor een verbetering van de testprestaties (tab. 2). Leyten et al. lieten ook zien dat er bij drie van de acht veelbelovende biomarkers uiteindelijk sprake was van een onafhankelijke toegevoegde waarde voor de detectie van GS ≥ 7 bij toevoeging van deze markers aan sPSA [11]. In de huidige studie bleek TDRD1 ook geen toegevoegde waarde te hebben. Een mogelijke verklaring zou zijn dat in deze studie gebruikgemaakt is van onbewerkte urine, en derhalve de waarde een ratio is en dus genormaliseerd is.

Om een groot aantal fout-negatieve uitslagen te voorkomen, is in deze studie gebruikgemaakt van een minimumwaarde voor KLK3 (<10.000 kopieën) voor patiënten met een HOXC6-DLX1-score $\leq 27,5$. Andere redenen voor een fout-negatieve HOXC6-DLX1-test zouden kunnen zijn dat er te weinig tumorcellen in de urine zijn vrijgekomen, bijvoorbeeld bij een kleine tumor of bij een bepaalde tumorlokalisatie (apex, kan niet bevoeld worden bij rectaal toucher). In deze klinische studies is urine bewaard in buisjes met fixatief van Gen-Probe (Hologic). Hypothetisch zou bij een meer geconcentreerd fixatief een grotere hoeveelheid urine gebruikt kunnen worden voor analyse, waardoor minder kans is op biomarkerwaarden onder de analytische detectielimiet. Dit zou nader onderzoek moeten uitwijzen.

In cohort A had 41% van de mannen prostaatacarcinoom in de bipten en in cohort B 47%. De literatuur komt tot vergelijkbare resultaten, te weten 34–44% [14–16]. Een verklaring voor het verschil tussen beide cohorten zou kunnen zijn dat in 2013 de ‘Richtlijn Prostaatacarcinoom’ van de Nederlandse Vereniging voor Urologie (NVU) aangepast is. Het is denkbaar dat nadien intensievere counseling van patiënten heeft plaatsgevonden, wat mogelijk invloed heeft

gehad op de uitslagen. Daarnaast werd in de richtlijn het gebruik van een risicocalculator aangeraden bij de besluitvorming rond het verrichten van prostaabiopen [17].

Op dit moment is geen enkele test honderd procent nauwkeurig voor het detecteren van prostaatacarcinoom. Het vaststellen van een afkapwaarde blijft een compromis tussen sensitiviteit en specificiteit, afhankelijk van het acceptabele risico voor het missen van significante tumoren.

In deze studie is gekozen voor een sensitiviteit van 90% voor het voorspellen van de aanwezigheid van hooggradig prostaatacarcinoom in prostaabiopen. De sensitiviteit van de HOXC6-DLX1-score was uiteindelijk 92% in beide cohorten en de specificiteit was 32% in cohort A en 37% in cohort B. Een hoge sensitiviteit is van belang bij het reduceren van de kans op het missen van een significante tumor, maar bij het verminderen van het aantal onnodige bipten blijft er een kans op het missen van GS ≥ 7 .

We erkennen dat een negatieve HOXC6-DLX1-score ($\leq 27,5$) de aanwezigheid van hooggradig prostaatacarcinoom niet volledig uitsluit. In cohort A hadden 131 (27%) mannen een HOXC6-DLX1-score $\leq 27,5$ en in cohort B waren dit 111 (30%) mannen. Van deze patiënten bleken negen (7%) respectievelijk zeven (6%) mannen een hooggradig prostaatacarcinoom te hebben. In totaal ($n=863$) hadden 242 biptieën (28%) voorkomen kunnen worden waarbij het risico op het missen van hooggradig prostaatacarcinoom 7% was geweest.

Momenteel wordt door het gebruik van een sPSA-afkapwaarde ook een deel van de significante carcinomen gemist. In de *Prostate Cancer Prevention Trial*, beschreven Thompson et al. dat in 15,2% van de gevallen prostaatacarcinoom aanwezig was bij mannen met een sPSA-waarde ≤ 4 ng/ml, en daarvan was 14,9% zelfs hooggradig (GS ≥ 7) [18]. Dit risico was heel laag voor patiënten met een sPSA-waarde <1 ng/ml, maar liep op tot 9,4% bij patiënten met een sPSA-waarde tussen de 3 en 4 ng/ml. Men zou hieruit kunnen concluderen dat

het risico op het missen van hooggradig prostaatcarcinoom nu dus tot 9,4% geaccepteerd is, wanneer een afkapwaarde van 4 ng/ml wordt gebruikt, of tot 5,7% wanneer een afkapwaarde van 3 ng/ml wordt gehanteerd [19].

De HOXC6-DLX1-score overtrof sPSA in het voorspellen van hooggradig prostaatcarcinoom in de 'grijze zone' (PSA 4–10 ng/ml). Bij een afkapwaarde van 27,5 zou 4% van de patiënten met hooggradig prostaatcarcinoom gemist worden bij sPSA-waarden van 4–10 ng/ml. Dit percentage is lager dan het huidige risico dat men loopt bij het gebruik van een sPSA-afkapwaarde van 2–4 ng/ml (7,2%) [19]. De verwachting is dat dit risico, met het gebruik van de HOXC6-DLX1-score verder teruggebracht kan worden bij sPSA-waarden 4,0 ng/ml. Het zou daarom interessant zijn om de waarde van de HOXC6-DLX1-score te onderzoeken bij patiënten met sPSA-waarden <4,0 ng/ml.

Als beperking van deze studie geldt met name het gebruik van de TRUS-geleide prostaatbipten als de hedendaagse gouden standaard voor de diagnostiek van prostaatcarcinoom. In een screeningsstudie bleek het percentage fout-negatieve uitslagen 17,9% te zijn bij mannen die TRUS-geleide prostaatbipten ondergingen [20]. Daarnaast is bekend dat bij TRUS-geleide bipten 20–30% van de significante tumoren gemist wordt, vooral tumoren die zijn gelegen in het anterieure deel en de apex van de prostaat [21]. Nieuwe beeldvormende technieken zouden de betrouwbaarheid van prostaatkankerdiagnostiek kunnen vergroten. Multiparametrische MRI (mpMRI) is een veelbelovende methode voor de diagnostiek van prostaatcarcinoom; de MR-geleide- en TRUS/MR-fusie-biopsietechnieken worden momenteel intensief onderzocht [22–24]. Recentelijk hebben nieuwe, functionele technologieën, zoals de 68 Ga-PSMA PET/CT-scan, ook veelbelovende resultaten laten zien voor de visualisatie van prostaattumoren [25].

Een andere beperking van de studie is het feit dat de prostaatbipten volgens lokaal protocol zijn afgenomen en beoordeeld. Het weefsel is niet centraal gereviseerd waardoor *interobserver variability* opgetreden zou kunnen zijn. Anderzijds zijn de bevindingen uit deze studie op deze manier wellicht beter te vertalen naar de algehele populatie.

Conclusie

De HOXC6-DLX1-urinetest is een veelbelovend hulpmiddel voor het voorspellen van hooggradig prostaatcarcinoom in prostaatbipten en zou daardoor gebruikt kunnen worden bij klinische besluitvorming, het verminderen van het aantal onnodige biopsieën en het beperken van potentiële overbehandeling. Toekomstig onderzoek zal zich moeten richten op de prestaties van de HOXC6-DLX1-score ten opzichte van andere (nieuwe) diagnostische en prognostische testen voor

prostaatcarcinoom. Uiteindelijk zal een nieuw diagnostisch pad ontwikkeld moeten worden, waarbinnen de verschillende veelbelovende methoden gecombineerd worden ten behoeve van het opsporen van klinisch significant prostaatcarcinoom.

Literatuur

1. Draisma G, Etzioni R, Tsodikov A, et al. Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: importance of methods and context. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(6):374–83.
2. Welch HG, Albertsen PC. Prostate cancer diagnosis and treatment after the introduction of prostate-specific antigen screening: 1986–2005. *J Natl Cancer Inst* 2009;101(19):1325–9.
3. Albertsen PC, Hanley JA, Fine J. 20-year outcomes following conservative management of clinically localized prostate cancer. *JAMA*. 2005;293(17):2095–101.
4. Groskopf J, Aubin SM, Deras IL, et al. APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem*. 2006;52(6):1089–95.
5. Gittelman MC, Hertzman B, Bailen J, et al. PCA3 molecular urine test as a predictor of repeat prostate biopsy outcome in men with previous negative biopsies: a prospective multicenter clinical study. *J Urol*. 2013;190(1):64–9.
6. Bussemakers MJ, Bokhoven A van, Verhaegh GW, et al. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 1999;59(23):5975–9.
7. Hessels D, Klein Gunnewiek JM, Oort I van, et al. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol*. 2003;44(1):8–15. discussion -6.
8. Auprich M, Chun FK, Ward JF, et al. Critical assessment of preoperative urinary prostate cancer antigen 3 on the accuracy of prostate cancer staging. *Eur Urol*. 2011;59(1):96–105.
9. Marks LS, Fradet Y, Deras IL, et al. PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. *Urology* 2007;69(3):532–5.
10. Ploussard G, Haese A, Van Poppel H, et al. The prostate cancer gene 3 (PCA3) urine test in men with previous negative biopsies: does free-to-total prostate-specific antigen ratio influence the performance of the PCA3 score in predicting positive biopsies? *BJU Int*. 2010;106(8):1143–7.
11. Leyten GH, Hessels D, Smit FP, et al. Identification of a Candidate Gene Panel for the Early Diagnosis of Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(13):3061–70.
12. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3(6):1101–8.
13. Laxman B, Morris DS, Yu J, et al. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res*. 2008;68(3):645–9.
14. Leyten GH, Hessels D, Jannink SA, et al. Prospective multicentre evaluation of PCA3 and TMPRSS2-ERG gene fusions as diagnostic and prognostic urinary biomarkers for prostate cancer. *Eur Urol*. 2014;65(3):534–42.
15. Tomlins SA, Aubin SM, Siddiqui J, et al. Urine TMPRSS2:ERG fusion transcript stratifies prostate cancer risk in men with elevated serum PSA. *Sci Transl Med*. 2011;3(94):94ra72.
16. Poppel H van, Haese A, Graefen M, et al. The relationship between Prostate CAncer gene 3 (PCA3) and prostate cancer significance. *BJU Int*. 2012;109(3):360–6.
17. Vugt HA van, Kranse R, Steyerberg EW, et al. Prospective validation of a risk calculator which calculates the probability of a positive prostate biopsy in a contemporary clinical cohort. *Eur J Cancer*. 2012;48(12):1809–15.



Hier staat een advertentie.



Bohn
Stafleu
van Loghum

Springer Media

Houten 2016

Hier staat een advertentie.



Bohn
Stafleu
van Loghum

Springer Media

Houten 2016

18. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level ≤ 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med*. 2004;350(22):2239–46.
 19. Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, et al. Assessing prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(8):529–34.
 20. Wolters T, Kwast TH van der, Vissers CJ, et al. False-negative prostate needle biopsies: frequency, histopathologic features, and follow-up. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(1):35–43.
 21. Roehl KA, Antenor JA, Catalona WJ. Serial biopsy results in prostate cancer screening study. *J Urol*. 2002;167(6):2435–9.
 22. Hoeks CM, Barentsz JO, Hambroek T, et al. Prostate cancer: multiparametric MR imaging for detection, localization, and staging. *Radiology*. 2011;261(1):46–66.
 23. Baco E, Rud E, Eri LM, et al. A Randomized Controlled Trial To Assess and Compare the Outcomes of Two-core Prostate Biopsy Guided by Fused Magnetic Resonance and Transrectal Ultrasound Images and Traditional 12-core Systematic Biopsy. *Eur Urol*. 2015.
 24. Tonttila PP, Lantto J, Paakko E, et al. Prebiopsy Multiparametric Magnetic Resonance Imaging for Prostate Cancer Diagnosis in Biopsy-naïve Men with Suspected Prostate Cancer Based on Elevated Prostate-specific Antigen Values: Results from a Randomized Prospective Blinded Controlled Trial. *Eur Urol*. 2015.
 25. Budaus L, Leyh-Bannurah SR, Salomon G, et al. Initial Experience of Ga-PSMA PET/CT Imaging in High-risk Prostate Cancer Patients Prior to Radical Prostatectomy. *Eur Urol*. 2015.
- drs. Rianne J. Hendriks**, arts-onderzoeker urologie
drs. Siebren Dijkstra, aios urologie
dr. Erik B. Cornel, uroloog
Sander A. Jannink, analist
Hans de Jong, analist
dr. Daphne Hessels, moleculair bioloog
Frank P. Smit, analist
dr. Willem J.G. Melchers, moleculair bioloog
dr. Gisèle Leyten, aios urologie
prof. dr. Theo M.de Reijke, uroloog
dr. Henk Vergunst, uroloog
dr. Paul Kil, uroloog
drs. Ben C. Knipscheer, uroloog
dr. Christina A. Hulsbergen-van de Kaa, patholoog
prof. dr. Peter F.A. Mulders, uroloog
dr. Inge M. van Oort, uroloog
prof. dr. Jack A. Schalken, hoogleraar experimentele urologie

