

University of Groningen

The assessment of oral squamous cell carcinoma

Boeve, Koos

DOI:
[10.33612/diss.135865241](https://doi.org/10.33612/diss.135865241)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Boeve, K. (2020). *The assessment of oral squamous cell carcinoma: A study on sentinel lymph node biopsy, lymphatic drainage patterns and prognostic markers in tumor and saliva*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.135865241>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

CHAPTER 10

**English summary &
Nederlandse samenvatting**

ENGLISH SUMMARY

Oral squamous cell carcinomas (OSCC) almost always primarily metastasize to the cervical lymph nodes; these are known as regional metastases. Lymph node status is an important prognostic factor for outcome and treatment decision making of head and neck cancer. However, not all regional metastases are clinically detectable with the current diagnostic modalities, such as computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI) or Ultrasound guided Fine Needle Aspiration Cytology (USgFNAC). Although they are clinically not detectable, regional metastases occur in 23-37% of the early stage (cT1-2N0) OSCC. These clinically undetectable metastases are known as occult metastases. Occult metastases are conventionally assessed by performing an elective neck dissection (END) after research showed higher rates of overall and disease specific survival compared to a watchful waiting strategy. However, an END has disadvantages: it leads to overtreatment in 63-77% of the cases and has a risk of postoperative morbidity (e.g. shoulder pain, reduced limb movement). Therefore, there is a need for a better and less invasive neck staging modality. In this thesis, we studied the predictive and prognostic value of the sentinel lymph node biopsy procedure, histopathological characteristics and molecular markers for the assessment of neck status in OSCC.

Because prior research showed a strong prognostic value for tumour infiltration depth and extranodal extension in OSCC, these histopathological characteristics were incorporated into the 8th edition of the American Joint Committee on Cancer TNM staging manual. However, the currently available 8th TNM validation studies lack patients with conservative neck treatment and changes in the classification especially affect patients with small tumours, which are often treated conservatively. In **chapter 2** we determined the impact of the implementation of the 8th TNM staging criteria. In a retrospective cohort of 211 first primary pT1–T2 OSCC patients with surgery as primary treatment, the old and new TNM staging criteria were compared. One hundred and seventy-three patients underwent a neck dissection and 38 patients had frequent clinical neck assessments. Classification according to the 8th edition criteria resulted in 36% total upstaging with the T classification and 16% total upstaging with the N classification. T3-restaged patients had lower 5-year disease-specific survival rates than T2-staged patients. Postoperative (chemo)radiotherapy could have been considered in another 3% of the patients on the basis of the 8th edition criteria. We concluded that addition of tumour infiltration depth and extranodal extension in the 8th TNM classification leads to better staging of oral squamous cell carcinoma and to a selection of patients who might benefit from an adjuvant treatment like postoperative (chemo)radiotherapy.

The sentinel lymph node biopsy (SLNB) was introduced in head and neck cancer staging as a minimally invasive alternative for an elective neck dissection in detecting occult neck metastases. Meta-analyses of SLNB accuracy showed heterogeneity in the existing studies for reference standards, imaging techniques and pathological examination. In **chapter 3** we determined the accuracy of the SLNB in detecting occult metastasis in 91 consecutive patients with primary cT1-2N0 OSCC treated by primary resection and neck staging by SLNB procedure between 2008 and 2016. The SLNB consisted of lymphoscintigraphy, SPECT-CT-scanning and gamma probe detection. Routine follow-up was the reference standard for the SLNB negative neck. Histopathological examination of sentinel lymph nodes (SLN) consisted of step serial sectioning, haematoxylin-eosin and cytokeratin AE1/3 staining. In all cases SLNs were harvested. A total of 27% patients had tumour-positive SLNs. Four patients were diagnosed with an isolated regional recurrence in the SLNB negative neck side resulting in an 85% sensitivity and a 94% negative predictive value. We concluded that the SLNB is a reliable procedure for surgical staging of the neck in case of oral cT1-2N0 SCC.

It is well known that patients with OSCC suffer a high risk for local recurrences (20-30%) and an annual risk of 3-4% for developing second primary tumours. The treatment of recurrences and second primary tumours is hampered by the previous treatment of the neck due to altered lymphatic drainage patterns. SLNB could be helpful to assess these altered lymphatic drainage patterns. Current evidence about the drainage patterns in previously treated OSCC patients using SLNB is limited to two small studies (n = 22 and n = 5). In **chapter 4** we retrospectively analysed 53 cT1-2N0 OSCC patients from three centres, who underwent SLNB between 2007 and 2016, after a history of neck surgery or radiotherapy. The SLNB procedure was identical to the procedure used in chapter 3. SLNs were detected in 85% of the cases. The SLNB had a sensitivity of 75% and negative predictive value of 98%. Unexpected drainage patterns were observed in 30% of the cases and in 12% no visible lymphatic drainage patterns were observed. We concluded that the SLNB seems to be a reliable procedure for neck staging of cT1-2N0 OSCC patients with a previously treated neck and enables visualization of unexpected drainage pattern variability.

Oral maxillary cancer is relatively rare compared with other anatomic subsites of oral cavity cancer (eg. tongue and floor of mouth) and is rarely included in studies on oral lymphatic drainage patterns. For this location of OSCC, low metastasis rates and drainage patterns to parapharyngeal located lymph nodes have previously been reported. In **chapter 5** we retrospectively studied drainage patterns of 11 patients with oral maxillary cancer that underwent a SLNB procedure. In 10 patients, SLNs were detected and harvested at cervical levels. In two patients, a parapharyngeal SLN was also detected. We concluded that in the majority of the maxillary cancer patients SLNs are located in cervical levels and only in a minority in the parapharyngeal area.

Another technique to assess OSCC patients without clinical and radiological neck involvement is selection using molecular tumour markers. The advantage of such markers is the non-invasive character. Chromosomal region 11q13, including genes *CCND1*, Fas-associated death domain (*FADD*) and *CTTN*, is often amplified in OSCC with nodal metastases. However, evidence in predicting occult nodal metastases is limited. In **chapter 6** we used 158 patients with early tongue and floor of mouth (FOM) squamous cell carcinomas to correlate the molecular markers *CCND1* amplification, cyclin D1, *FADD* and cortactin protein expression with occult nodal metastases. *CCND1* amplification and cyclin D1 expression correlated with occult nodal metastases. Cyclin D1 expression was validated in an independent multicenter cohort, confirming the correlation with occult nodal metastases in early FOM cancers. Therefore, cyclin D1 is a predictive biomarker for occult nodal metastases in early FOM cancers.

Preoperative selection of patients at risk for occult metastasis using molecular tumour markers might lead to a more individualized neck strategy with a watchful waiting strategy for low risk patients, a SLNB for intermediate risk patients and an elective neck dissection for patients with a high risk. The additional and more detailed information on individual drainage patterns, micrometastasis and isolated tumour cells provided by the SLNB might have impact on the clinical value of molecular biomarkers that have previously been associated with nodal status. In **chapter 7** associations between molecular tumour markers (cortactin, cyclin D1, *FADD*, *RAB25* and *S100A9*) and lymph node metastasis was investigated in 87 early stage OSCC patients who underwent SLNB neck staging. Cortactin was associated with lymph node status in patients with a pT1 tumour and infiltration depth <4 mm with a negative predictive value of 92%. Therefore, cortactin is a promising tumour marker to select early stage OSCC patients for a watchful waiting strategy instead of a SLNB.

Not only the detection of occult lymph node metastasis is challenging in OSCC, also the early detection of local recurrences and second primary tumours is a major challenge. The high local recurrence rate of 20-30% in patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC) is partly caused by residual tumour cells of the first primary tumour and the presence of precancerous epithelium (field cancerization) that has not (yet) clinically manifested. Due to this field cancerization, the risk for a second primary tumour is about 20%. Since OSCC cells are shed into the oral cavity, the detection of tumour-specific DNA methylation markers in saliva could be a tool for the early detection of local recurrences or second primary tumours of OSCC. In **chapter 8** we selected seven genomic locations representing six genes (*C11orf85*, *CMTM2*, *FERMT3*, *KCNA5*, *SIPA1* and *TBX4*) that are methylated in OSCC and not in normal cells from a genome-wide methylation screening analysis using MethylCap-Seq analysis of 12 OSCCs compared to controls. In addition, we selected 4 markers reported to be methylated in saliva of OSCC patients by others (*EDNRB*, *HOXA9*, *NID2* and *TIMP3*).

Quantitative methylation specific PCR analysis using saliva from ten OSCC patients compared to ten non-cancer controls of similar or younger age, revealed only a difference for *KCNA5* methylation. Moreover, when *KCNA5* was combined with other markers, the combination with *TIMP3* revealed a 100% diagnostic potential in detecting OSCC patients compared to non-cancer controls of similar age using saliva. We concluded that this newly discovered *KCNA5* by MethylCap-Seq combined with *TIMP3* might be useful for early detection of local recurrence or second primary tumours in saliva cells of OSCC patients.

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het merendeel van de tumoren in de mondholte zijn orale plaveiselcelcarcinomen (OPCC's), die uitgaan van het mondslijmvlies. Wanneer OPCC's uitzaaien gaat dit vrijwel altijd eerst naar de lymfeklieren in de hals, dit worden regionale metastasen genoemd. In een later stadium kunnen ook metastasen via de bloedbaan "op afstand" ontstaan naar bijvoorbeeld de longen. De aan- of afwezigheid van regionale metastasen is een belangrijke prognostische factor voor de uitkomst van de ziekte en voor de keuze van de behandeling van OPCC's. Echter niet alle regionale metastasen zijn klinisch te detecteren met de huidige diagnostische technieken, zoals de computertomografie (CT) scan, magnetic resonance imaging (MRI) scan of de echogeleide cytologische punctie. Ondanks dat ze met deze relatief gevoelige klinische technieken niet detecteerbaar zijn, blijken er toch regionale metastasen in de lymfklier aanwezig te zijn in 23-37% van de patiënten met een vroeg stadium OPCC (cT1-2N0). Deze klinisch niet te detecteren regionale en afstandsmetastasen worden occulte metastasen genoemd. Occulte regionale metastasen werden in het verleden gediagnosticeerd door de lymfeklieren van level I-III van de hals als één blok met de omgevende weke delen te verwijderen, een zogenoemde electieve halsklierdissectie. Een electieve halsklierdissectie kreeg de voorkeur nadat onderzoek aantoonde dat dit voor een betere overleving zorgde in vergelijking met het achterwege laten van een halsklierdissectie en te volstaan met poliklinische controle. Echter met deze electieve halsklierdissectie worden de 63-77% patiënten, die geen occulte metastase blijken te hebben, onnodig geopereerd. Een dergelijke ingreep heeft risico's op postoperatieve morbiditeit, bijvoorbeeld schouderpijn of een bewegingsbeperking van de schouder en de arm. Dit nadeel geeft aan dat er een noodzaak is voor nauwkeurige en minder invasieve methoden om occulte metastasen te kunnen detecteren. In dit proefschrift deden we onderzoek naar de voorspellende waarde voor het aantonen van occulte metastasen door gebruik te maken van de schildwachtklierbiopsie procedure, histopathologische karakteristieken en moleculaire tumormarkers.

Nadat verschillende studies hadden aangetoond dat tumor infiltratiediepte en extranodale groei sterk prognostisch waren voor de overleving na de behandeling van het OPCC, werden deze histopathologische karakteristieken toegevoegd aan de 8^e editie van de American Joint Committee on Cancer TNM classificatie. De studies die de basis vormden voor de aanpassing van de TNM classificatie, bevatten echter geen patiënten die een conservatieve behandeling van de hals hebben gehad, terwijl deze toevoegingen aan de TNM classificatie mogelijk vooral invloed hebben op de behandeling van patiënten met een vroeg stadium tumor. In **hoofdstuk 2** bepaalden we de klinische impact van de aanpassingen in de nieuwe TNM classificatie in een retrospectieve database van 211 patiënten met een eerste primaire pT1-2 OPCC die allemaal primair chirurgisch zijn behandeld. Honderddrieënzeventig

van deze patiënten werden behandeld met een halsklierdissectie en 38 werden alleen poliklinisch gecontroleerd op uitgroei van occulte metastasen. Classificatie volgens de 8^e TNM editie resulteerde voor 36% van de patiënten in een hogere T stagering en in 16% van de patiënten in een hogere N stagering. De T3 gestageerde patiënten hadden een kortere overleving dan de T2 gestageerde patiënten. Aan de hand van de 8^e TNM classificatie had in 3% van de patiënten een aanvullende postoperatieve behandeling met chemo- of radiotherapie overwogen kunnen worden. We concludeerden dat de toevoeging van tumor infiltratiediepte en extranodale groei aan de 8^e editie van de TNM classificatie zorgt voor de identificatie van meer OPCC patiënten met een slechtere prognose en van meer patiënten die mogelijk voordeel hebben van een (intensieve) adjuvante behandeling.

De schildwachtklierbiopsie (SWK-biopsie) procedure werd geïntroduceerd voor OPCC's als minder invasieve stageringsmethode voor de hals, in vergelijking met de electieve halsklierdissectie, om te vermijden dat patiënten zonder occulte metastasen een halsklierdissectie ondergaan. Meta-analyses naar de accuratesse van de SWK-biopsie laten veel verschillen tussen studies zien als het gaat om referentie standaarden, beeldvormende technieken en histopathologische beoordelingen. In **hoofdstuk 3** bepaalden we de accuratesse van de SWK-biopsie voor het detecteren van occulte metastasen in 91 patiënten met een primaire cT1-2N0 OPCC, die primair chirurgisch werden behandeld en een SWK-biopsie ondergingen tussen 2008 en 2016. De SWK-biopsie procedure bestond uit SWK detectie met een lymfoscintigrafie scan, SPECT-CT scan en een gamma-probe. Poliklinische controle diende als referentie voor de 63% van de patiënten met een negatieve SWK-biopsie. Histopathologisch onderzoek van de SWK bestond uit het snijden van de schildwachtklier op meerdere niveau's en de detectie van occulte metastasen op basis van standaard histopathologisch onderzoek en een cytokeratine kleuring. In alle 91 patiënten werden SWK's gevonden. In totaal hadden 27% van de patiënten een metastase-positieve SWK. Vier patiënten werden gediagnosticeerd met een regionaal recidief nadat er eerder met de SWK-biopsie geen occulte metastase was aangetroffen. Dat resulteert in een sensitiviteit van 85% en een negatief voorspellende waarde van 94%. We concludeerden dat de SWK-biopsie procedure betrouwbaar is voor het stageren van de hals van cT1-2N0 OPCC patiënten.

Het is bekend dat 20-30% van de patiënten met een OPCC een lokaal recidief krijgen en dat deze patiënten een jaarlijks risico hebben van 3-4% op een tweede primaire tumor. Eerdere behandelingen van de hals kunnen de lymfogene drainagepatronen veranderen. De literatuur over mogelijk afwijkende drainagepatronen in eerder voor een OPCC behandelde patiënten, in kaart gebracht met de SWK-biopsie procedure, is beperkt tot twee kleine studies. In **hoofdstuk 4** onderzochten we retrospectief 53 cT1-2N0 OPCC patiënten uit drie hoofd-hals oncologie centra, die een SWK-biopsie procedure hebben ondergaan tussen

2007 en 2016, nadat ze eerder chirurgische of radiotherapeutische behandeling van de hals hebben gehad. De SWK-biopsie procedure was gelijk aan de procedure zoals beschreven in hoofdstuk 3. SWK's werden in de 85% van de patiënten gedetecteerd. De SWK-biopsie procedure had een sensitiviteit van 75% en een negatief voorspellende waarde van 98%. Drainagepatronen naar onverwachte locaties waren aanwezig in 30% van de patiënten en bij 12% kon helemaal geen drainagepatroon worden aangetoond. We concludeerden dat de SWK-biopsie procedure een betrouwbare techniek lijkt te zijn voor het stageren van de hals van patiënten met een OPCC. Daarnaast maakt de SWK-biopsie procedure het mogelijk om onverwachte lymfogene drainagepatronen te visualiseren in de hals van cT1-2N0 OPCC patiënten die eerder behandeling van de hals hebben ondergaan.

Patiënten met een OPCC uitgaande van de bovenkaak (maxilla) komen minder vaak voor in vergelijking met de andere locaties in de mond, zoals de tong of mondbodem en worden nauwelijks geïnccludeerd in onderzoeken naar lymfogene drainagepatronen van dit gebied. In het verleden werden lage metastaseringspercentages verondersteld en daarnaast bestond de indruk dat de drainage vooral naar parafaryngeaal gelegen lymfeklieren plaatsvindt. In **hoofdstuk 5** onderzochten we retrospectief de drainage patronen van 11 patiënten met een OPCC uitgaande van de maxilla aan de hand van de SWK-biopsie procedure. In 10 patiënten werden de SWK's gevonden in cervicale hals levels. In twee patiënten werden daarnaast parafaryngeaal gelokaliseerde lymfeklieren gevonden. We concludeerden dat in de meerderheid van een OPCC uitgaande van de maxilla, op basis van de SWK's, de drainage naar de cervicale lymfeklieren verloopt.

Een andere techniek om te voorkomen dat patiënten zonder occulte metastasen een halsklierdissectie ondergaan, is de selectie aan de hand van prognostische moleculaire markers in de primaire tumor. Het voordeel hiervan is dat dit een niet invasieve methode voor het stageren van de hals is. Chromosoom regio 11q13, waarop onder meer de genen *CCND1*, Fas-associated death domain (*FADD*) en *CTTN* zijn gelegen, is vaak geamplificeerd in OPCC's met regionale metastasen. Echter, het bewijs dat amplificatie van het 11q13 chromosoom of de over-expressie van de daarop gelegen genen, voorspellend is voor de aanwezigheid van occulte metastasen is nog minimaal. In **hoofdstuk 6** gebruikten we 158 patiënten met een vroeg stadium tong of mondbodem PCC om de moleculaire markers *CCND1* amplificatie en de expressie van cycline D1 (*CCND1*), *FADD* en cortactin (*CTTN*) te correleren met occulte metastasen. *CCND1* amplificatie en cycline D1 expressie correleerden met de aanwezigheid van occulte metastasen. De validatie van cycline D1 in een onafhankelijk multicenter cohort, bevestigde de correlatie met occulte metastasen voor vroeg stadium mondbodem tumoren. We concludeerden dat cycline D1 een voorspellende marker is voor de aanwezigheid van occulte metastasen.

Preoperatieve selectie van patiënten met een hoog risico op occulte metastasen met moleculaire markers kan leiden tot een meer individuele behandelstrategie voor de hals, met poliklinische controle voor laag risico patiënten. Voor patiënten met een gemiddeld tot hoog risico is een SWK-biopsie de eerste keus en een electieve halsklierdissectie in de gevallen waar een SWK-biopsie niet betrouwbaar kan worden verricht. De meer gedetailleerde informatie over drainage patronen, micrometastasen en geïsoleerde tumorcellen die wordt verkregen met de SWK-biopsie kan van invloed zijn op de klinische waarde van moleculaire markers die eerder zijn geassocieerd met lymfeklierstatus. In **hoofdstuk 7** werden markers, eerder beschreven als voorspellend voor lymfeklierstatus (cortactin, cycline D1, FADD, RAB25 en S100A9), geassocieerd met occulte metastasen in 87 patiënten met een vroeg stadium OPCC die een SWK-biopsie hebben ondergaan. Cortactin was geassocieerd met de aanwezigheid van occulte metastasen in patiënten met een pT1 tumor en een tumor infiltratiediepte van minder dan 4 mm met een negatief voorspellende waarde van 92%. We concludeerden dat cortactin een veelbelovende marker is voor de selectie van vroeg stadium OPCC patiënten voor een klinische controle in plaats van een SWK-biopsie.

Naast het detecteren van occulte metastasen is de vroegdetectie van lokale recidieven en tweede primaire tumoren een grote uitdaging in OPCC patiënten. Het aanzienlijke percentage lokale recidieven en tweede primaire tumoren (20-30%) wordt respectievelijk veroorzaakt door residuale tumorcellen van de eerste primaire tumor en/of door de aanwezigheid van premaligne epitheel dat (nog) niet klinisch zichtbaar is. Aangezien PCC cellen die loskomen van het oppervlakte van de tumor terechtkomen in het speeksel, kan het zijn dat de detectie van tumor-specifieke DNA methylatie in DNA uit speekselcellen kan dienen als een techniek voor het detecteren van lokale recidieven of tweede primaire tumoren. In **hoofdstuk 8** selecteerden we genomische gebieden van zes genen (*C11orf85*, *CMTM2*, *FERMT3*, *KCNA5*, *SIPA1* en *TBX4*) die gemethyleerd zijn in OPCC's en niet in normale cellen. Voor de identificatie van deze OPCC-specifieke methylatie markers werd gebruik gemaakt van een screening van het totale methyloom van 12 OPCC's en controle weefsels met behulp van een MethylCap-Seq analyse. Daarnaast selecteerden we vier markers uit de literatuur die werden beschreven als gemethyleerd in speeksel van OPCC patiënten (*EDNRB*, *HOXA9*, *NID2* en *TIMP3*). Een kwantitatieve methylatie specifieke PCR analyse van speeksel van tien OPCC patiënten in vergelijking met het speeksel van tien niet-OPCC controles liet alleen een verschil zien voor de methylatie van *KCNA5*. Wanneer *KCNA5* werd gecombineerd met andere markers was een 100% diagnostisch potentieel zichtbaar voor de combinatie met *TIMP3* in het detecteren van OPCC patiënten en niet-OPCC controles van dezelfde leeftijd aan de hand van het speeksel. Op basis van onze pilotstudie concludeerden we

dat *KCNA5* een potentiële nieuwe methylatiemarker is voor de vroegdetectie van lokale recidieven of tweede primaire tumoren in het speeksel van OPCC patiënten en dat grotere studies ter bevestiging van de klinische waarde van deze markers gerechtvaardigd zijn.

