



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Clinical implications of immunecell infiltration in vulvar intraepithelial neoplasia**

Esch, Edith Margarethe Gertrude van

### **Citation**

Esch, E. M. G. van. (2015, December 1). *Clinical implications of immunecell infiltration in vulvar intraepithelial neoplasia*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/36504>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/36504>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/36504> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Esch, Edith van

**Title:** Clinical implications of immune cell infiltration in vulvar intraepithelial neoplasia

**Issue Date:** 2015-12-01

# CHAPTER 9

## NEDERLANDSE SAMENVATTING





Vulvaire intra-epitheliale neoplasie (VIN) is een relatief weinig voorkomende afwijking aan de schaamlippen met vaak een langdurig beloop en recidiverend karakter. VIN is een voorstadium van schaamlipkanker. Er zijn twee typen van VIN te onderscheiden; differentiated VIN (dVIN) en usual VIN (uVIN). uVIN wordt veroorzaakt door een voortdurende infectie met het humaan papilloma virus (HPV) bij patiënten van wie het afweersysteem er niet slaagt om de infectie op te ruimen. Door de stijging in het aantal HPV infecties is er ook sprake van een toename van uVIN in met name jonge vrouwen. De kans op het spontaan verdwijnen van uVIN afwijkingen is met 1.5% laag. De kans dat uVIN zich tot schaamlipkanker ontwikkelt is 10% als er geen behandeling plaats vindt en als de uVIN afwijking wel wordt behandeld dan verminderd de kans naar 3-4%. uVIN geeft bij de meeste vrouwen klachten als jeuk, pijn en/of branderigheid maar ook psychoseksuele klachten. Indien de uVIN afwijking geen klachten geeft en er geen verdenking is dat er kankervorming plaatsvindt, kan er gekozen worden voor een afwachtend beleid met regelmatige poliklinische controles. Een behandeling van uVIN is in de meerderheid van de patiënten echter wel nodig, omdat ze klachten ervaren. Standaard chirurgische behandelingen voor uVIN zijn het chirurgisch verwijderen van de afwijking of lasertherapie. Na deze standaard behandelingen komt de afwijking in 20-40% van de gevallen weer terug. Daarnaast kan een chirurgische behandeling leiden tot misvorming van de schaamlippen, wat vaak samen gaat met psychoseksuele klachten. Dit is de reden dat er momenteel behandelingen worden ontwikkeld die het afweersysteem activeren om zo het HPV virus en de daardoor veroorzaakte uVIN afwijking te bestrijden.

Sinds de jaren 70 is het bekend dat HPV baarmoederhalskanker veroorzaakt en in 1982 toonde onderzoek aan dat HPV ook VIN afwijkingen veroorzaakt. HPV is een seksueel overdraagbaar virus waarvan er meer dan 100 soorten bekend zijn. Deze zijn onderverdeeld in zogenoemde laag risico virussen die bijvoorbeeld wratten kunnen veroorzaken en in hoog risico virussen, zoals HPV 16 en 18, die baarmoederhalskanker en ook uVIN kunnen veroorzaken. Ongeveer 80% van de mensen wordt in zijn leven besmet met één of meerdere HPV infecties. In de meeste gevallen zal het afweersysteem deze infecties binnen 1-2 jaar onder controle krijgen zonder dat er klachten ontstaan. Indien het afweersysteem niet in staat is om dit virus op te ruimen, wat in ongeveer 10% van de mensen het geval is, dan is er sprake van een chronische HPV infectie die afwijkingen in de slijmvliezen van zowel het genitale gebied (baarmoederhals, schaamlippen, vagina en anus) als in de hoofd-hals regio kan veroorzaken (amandelen). Risicofactoren voor het krijgen van een voortdurende HPV infectie zijn het aantal seksuele partners, roken en gebruik van orale anticonceptie. Sinds een aantal jaar is er een preventief vaccin beschikbaar tegen de meest vóórkomende typen hoog risico HPV 16 en 18, die in 2010 is opgenomen in het rijksvaccinatieprogramma voor meisjes. Het doel van deze vaccinatie is om een HPV 16 en 18 infectie te voorkomen en daarmee het aantal HPV-veroorzaakte afwijkingen te verlagen. Helaas is het percentage

jonge meisjes dat gevaccineerd in Nederland lager dan gehoopt (variërend per regio van 31% tot 61%). Doordat het een lange tijd duurt voordat een afwijking zich door HPV ontwikkelt, zal het ook lang duren voordat men het beschermende effect van het preventieve vaccin ziet. Daarom is behandeling en opsporing van HPV veroorzaakte afwijkingen nog steeds van groot van belang.

Het afweersysteem is een zeer complex geheel met het doel de mens te beschermen tegen indringers van buiten en afwijkingen binnen het lichaam. Het kan globaal worden onderverdeeld in het aangeboren afweersysteem en het verworven afweersysteem. Het aangeboren afweersysteem kan direct, snel en altijd met dezelfde kracht reageren op indringende ziekteverwekkers in de omgeving. Cellen die onderdeel uitmaken van het aangeboren afweersysteem zijn onder andere: natural killer (NK) cellen en antigeen presenterende cellen (APC) zoals macrofagen en dendritische cellen (DCs). APC's zijn in staat zijn om het verworven afweersysteem activeren.

Het verworven afweersysteem is heel specifiek en kan tegen delen die uniek zijn voor ziekteverwekkers zoals virussen, bacteriën of kanker cellen reageren. Het duurt langer voordat een verworven afweerreactie op volle sterkte is, maar de reactie is zeer krachtig en specifiek gericht tegen de afzonderlijke ziekteverwekkers. Bovendien zorgt deze afweerreactie ervoor dat er een geheugen opgebouwd kan worden tegen deze ziekteverwekkers. Dit geheugen zorgt ervoor dat wanneer men dezelfde ziekteverwekker nog een keer tegenkomt, men er dan niet meer ziek van wordt. In de verworven afweerreactie spelen vooral de witte bloedcellen (lymfocyten) een belangrijke rol.

Subpopulaties van lymfocyten zijn onder andere B- en T-cellen. B-cellen maken antistoffen die de buitenkant van virussen kunnen herkennen en op die manier kunnen voorkomen dat het virus het lichaam kan infecteren. De B-cellen zijn belangrijk voor de werking van het preventieve HPV vaccin. T-cellen zijn van groot belang in de afweer tegen onder andere virale infecties zoals HPV wanneer de infectie al heeft plaatsgevonden. Er zijn verschillende soorten T-cellen te onderscheiden: de T-helper cellen (CD4+), cytotoxische T-cellen (CD8+) en ook regulatoire T-cellen (Treg). De CD4+ T-helper cellen activeren B cellen, ondersteunen de werking van cytotoxische CD8+ T-cellen en kunnen het gewenste type afweerreactie stimuleren. Globaal kunnen er twee T-helper afweerreacties onderscheiden worden die het afweersysteem sturen: een type 1 en een type 2 afweerreactie. De type 1 reactie resulteert in het opruimen van geïnfecteerde cellen door stimulatie van macrofagen en cytotoxische T cellen en kenmerkt zich door de productie van signaalstoffen (cytokines) zoals IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  en IL-2. De type 2 reactie resulteert activatie van B cellen en is een chronische ontstekingsreactie die zich kenmerkt door cytokines zoals IL-4, IL-5 en IL-10. Cytotoxische T-cellen kunnen geïnfecteerde cellen en tumorcellen opruimen en zijn van groot belang in een effectieve afweerreactie. Regulatoire T-cellen remmen de afweerreactie omdat ze in

staat zijn om de activatie van andere afweercellen te onderdrukken. Dit is belangrijk om bijvoorbeeld allergie of autoimmuunziekten te voorkomen, maar ook om te zorgen dat er geen lichaamsschade optreed bij een te sterke afweerreactie.

Het is bekend dat in het geval van voortdurende HPV infecties en het ontstaan van uVIN zowel de aangeboren als verworven afweerreactie tegen HPV onderdrukt of niet geactiveerd is. Het merendeel van de macrofagen in uVIN zijn gericht op het dempen van de afweerreactie. Er zijn minder T-cellen gericht tegen HPV terwijl diegene die er zijn minder actief zijn. Bovendien worden ze in de uVIN vaak ook vergezeld door grotere aantallen van regulatoire T-cellen.

Aangezien we weten dat het falen van het afweersysteem om HPV te controleren in een klein deel van de patiënten tot het ontwikkelen van uVIN leidt, is er de afgelopen jaren veel aandacht uitgegaan naar immunotherapie als behandelmethode voor uVIN. Immunotherapie heeft als doel om het afweersysteem zodanig te activeren dat de HPV infectie en de afwijking ten gevolge van HPV worden opgeruimd.

Er kunnen twee soorten immunotherapie worden onderscheiden. Lokale immunotherapie grijpt direct aan op de afwijking zelf en beoogt de activering van het afweersysteem in de uVIN zelf. Een voorbeeld hiervan is het gebruik van imiquimod crème (Aldara®). Systemische immunotherapie zorgt voor activatie van het afweersysteem in het hele lichaam. Therapeutische HPV vaccinatie is hiervan een voorbeeld. Het vaccin stimuleert de lymfocyten van het verworven afweersysteem om tegen delen van het HPV te reageren. Deze lymfocyten circuleren door het lichaam om HPV infecties/afwijkingen op te sporen en daarna te vernietigen. Therapeutische vaccins bestaan in verscheidene vormen die heden ten dage in onderzoekverband worden getest. Eén type vaccin, het HPV 16 synthetic long peptide (HPV16 SLP) vaccin, ontwikkeld in het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC), geeft een krachtige stimulus aan het verworven afweersysteem wat samen gaat met het (deels) verdwijnen van uVIN in een groot aantal patiënten. Zowel de lokale als systemische immunotherapie van uVIN heeft geresulteerd in veel belovende resultaten in meer dan de helft van alle behandelde patiënten. Een aanzienlijk deel van de patiënten reageert helaas (nog) niet op deze therapieën.

Dit proefschrift richt zich op het lokale en systemische afweersysteem in uVIN patiënten. Het doel is om meer inzicht te krijgen in de rol en het falen van het afweersysteem in uVIN en hoe dit de reactie op immunotherapie kan beïnvloeden. Hiertoe hebben we bij een geselecteerde groep uVIN patiënten uit het LUMC, de patiënt karakteristieken, de lokale en de systemische afweerreactie in kaart gebracht.

In **hoofdstuk 2** van dit proefschrift wordt een gedetailleerd overzicht van de eigenschappen van de aangeboren en verworven afweerreactie tegen HPV, en bij uVIN in het bijzonder, gegeven. Daarnaast beschrijven we verschillende vormen van immunotherapie voor uVIN en wordt er een overzicht gegeven van mogelijke oorzaken van het falen van immunotherapie in uVIN. Dit review vormt de basis voor de verschillende studies in dit proefschrift.

In **hoofdstuk 3** beschrijven we de patiënt karakteristieken van onze onderzoeksgroep van uVIN patiënten. Hieruit blijkt dat in onze onderzochte populatie alleen het op meerdere plekken aanwezig zijn van uVIN afwijkingen een voorspeller is voor het snel terugkomen van uVIN nadat deze eerder door een chirurgische behandeling was verwijderd. Eerder beschreven voorspellende patiënt karakteristieken als roken en het nog aanwezig zijn van uVIN in de randen van het operatiegebied waren in deze groep niet van belang voor het verdere beloop van de ziekte. Het multifocaal aanwezig zijn van uVIN als ongunstige voorspeller hebben we mee laten wegen in alle volgende onderzoeken over het belang van afweercellen in het verdere beloop van de uVIN afwijking.

### **Veranderingen in de lokale afweerreactie in uVIN**

uVIN wordt gekenmerkt door een ruime hoeveelheid aan verschillende typen afweercellen die zich in de afwijking bevinden. Alhoewel deze afweercellen aanwezig zijn in de uVIN afwijking blijken ze toch niet in staat te zijn om de HPV infectie op te ruimen en de uVIN afwijking te laten verdwijnen. De functie van deze cellen is dus verminderd of niet van het juiste type benodigd voor het opruimen van de uVIN cellen. In een effectieve afweerreactie tegen uVIN is de hoeveelheid en verhouding van cytotoxische CD8+T-cellen (die de geïnfecteerde cellen op kunnen ruimen) en regulatoire T-cellen (die de afweerreactie onderdrukken) van groot belang. Het recidiveren van uVIN, het ontstaan van schaamlipkanker en het niet reageren op immunotherapie wordt namelijk gekenmerkt door minder cytotoxische T-cellen en meer regulatoire T-cellen (**hoofdstuk 5**).

De effectiviteit van T-cellen, maar ook NK cellen, wordt beïnvloedt door de aan- of afwezigheid van het zogenoemde humaan leukocyten antigeen (HLA) molecuul op afweercellen. Dit molecuul toont aan de buitenkant van de geïnfecteerde cel een klein stukje van het virus waardoor de cel herkent kan worden door T-cellen. In **hoofdstuk 4** hebben we daarom de aanwezigheid van verschillende HLA moleculen bestudeerd. HLA klasse I, dat nodig is voor de herkenning van geïnfecteerde cellen door cytotoxische T-cellen, is verminderd aanwezig bij de meerderheid van uVIN afwijkingen. Dit verlies aan HLA klasse I lijkt echter geen probleem te zijn in de effectiviteit van immunotherapie.. Het verlies aan HLA klasse I in uVIN was meestal niet het gevolg van een genetische irreversibele verandering. In reactie op IFN $\gamma$  (een cytokine kenmerkend voor een type 1 verworven afweerreactie) werd de expressie



HLA klasse I op huidcellen van uVIN weer gestimuleerd. In uVIN patiënten die behandeld werden met het therapeutische HPV-16 SLP vaccin zagen we bovendien dat patiënten die niet reageerden op het vaccin wel HLA klasse I tot expressie te brachten, terwijl patiënten die wel reageerden soms minder HLA klasse I hadden. In schaamlipkanker lijkt dit anders te zijn. Minder HLA klasse I is hier wel vaak het gevolg van een genetische verandering. De niet klassieke HLA moleculen -E en -G, die een remmende werking op T en NK cellen hebben, worden niet tot expressie gebracht in uVIN maar wel in ongeveer de helft van de patiënten met schaamlipkanker. De combinatie van HLA-E en -G expressie met irreversibele genetische veranderingen in HLA klasse I, maakt immunotherapie in schaamlipkanker mogelijk moeilijker dan in uVIN.

De functie en het type van de aanwezige afweercellen in uVIN kunnen beïnvloed zijn. Ze kunnen in een uitgeputte of niet functionele staat verkeren waardoor het afweersysteem de afwijking niet voldoende aanvalt. In **hoofdstuk 5** hebben we daartoe naast het vaststellen van de hoeveelheid en verhouding van de verschillende T cellen ook de aanwezigheid van zogenoemde co-inhibitie moleculen op T-cellen onderzocht. In **hoofdstuk 6** hebben we tevens de hoeveelheid en het type macrofagen in uVIN onderzocht waarna we beide datasets aan elkaar gekoppeld hebben. Een effectieve afweerreactie in uVIN kenmerkt zich door geactiveerde IFN $\gamma$  producerende T-cellen en de relatieve afwezigheid van macrofagen en regulatoire T-cellen. Deze combinatie van afweercellen in de uVIN afwijking is geassocieerd met het (lang) uitblijven van recidieven.

In het lokale afweersysteem van uVIN is het dus van belang dat immunotherapie een goede activatie van het afweersysteem bewerkstelligd die zich kenmerkt door IFN $\gamma$  productie. Een gunstige samenstelling van afweercellen voorafgaand aan immunotherapie zal het waarschijnlijk makkelijker maken om de uVIN afwijking te laten verdwijnen. De afweercellen zijn immers al aanwezig, ze hoeven niet nog naar de afwijking toe te komen en hebben geen verminderde functie. Een boost van de al aanwezige afweerrespons kan dan genoeg zijn, terwijl immunotherapie in patiënten met een onderdrukte, niet effectieve afweerrespons, lastiger zal zijn. Deze patiënten zullen baat hebben bij een bredere aanpak om zowel de functie als het type aanwezige afweercellen te beïnvloeden.

### **Veranderingen in de systemische afweerreactie in uVIN**

Systemische HPV specifieke afweer is van belang voor het verdwijnen van HPV afwijkingen. In het bloed van uVIN patiënten is deze afweer meestal zwak of niet aanwezig. Het opwekken van deze HPV specifieke afweerrespons na therapeutische HPV 16 SLP vaccinatie leidt tot het verdwijnen van de uVIN afwijking. Niet alle patiënten blijken in staat tot het opwekken van sterke HPV specifieke afweer reactie. Dit duidt erop dat er verschillen bestaan in de mogelijkheid van het afweersysteem om te reageren op de therapeutische vaccinatie.

In **hoofdstuk 7** worden, net als eerder voor het lokale afweersysteem, verschillen in type en functie van afweercellen aanwezig in het bloed onderzocht. De functie van T-cellen om signaalstoffen uit te scheiden en van macrofagen om afweercellen te activeren, is gelijk in gezonde controles. Co-inhibitie moleculen op T-cellen zijn nauwelijks aanwezig. Echter net als bij het lokale afweersysteem, zijn IFN $\gamma$ -producerende T-cellen van belang. In patiënten met recidiverende uVIN afwijkingen komen minder van deze actieve T-cellen voor. Naast deze actieve T-cellen zijn er in patiënten met recidiverende uVIN afwijkingen minder dendritische cellen en meer type 2 (afweer remmende) monocytten. In uVIN patiënten met recidieven lijkt er sprake van een verminderde mogelijkheid tot activatie van de HPV specifieke afweer door een tolerant, minder effectief afweersysteem.

De mogelijkheid tot activatie van afweercellen in reactie op signaalstoffen (cytokines) en het type afweerreactie hierop hebben we onderzocht met behulp van het meten van fosforylatie van signal transduction activators of transcription (STAT). STAT fosforylatie in afweercellen is na stimulatie met verschillende cytokines gelijk in uVIN patiënten en gezonde controles. Stimulatie met afweer stimulerende stoffen IFN $\alpha$  en GM-CSF resulteerde wel in verschillen. In uVIN patiënten lijken de voorloper cellen van antigeen presenterende cellen minder in staat om IFN $\gamma$  geassocieerde responsen op te wekken. In de uVIN patiënten die behandeld werden met therapeutische HPV 16 SLP vaccinatie bleken de patiënten waar het afweersysteem goed reageerde op vaccinatie, ook beter in staat om IFN $\gamma$  geassocieerde responsen op te wekken na stimulatie met IFN $\alpha$ . IFN $\alpha$  kan gezien worden als een sterke afweer modulator die vooral IFN $\gamma$  geassocieerde responsen opwekt. IFN $\alpha$  zou mogelijk aanvullend kunnen zijn op bestaande immunotherapie om hun effecten te versterken.

Bovenstaande resultaten suggereren dat de systemische myeloïde cellen (voorlopers van) dendritische cellen en macrofagen) in patiënten met uVIN zowel in type als functie veranderd zijn. Het recidiveren van uVIN is gerelateerd aan type 2 monocytten in het bloed is en de aanwezigheid van macrofagen in de uVIN afwijking. Nader onderzoek is nodig om te kijken of het meten van deze type 2 monocytten kan dienen als bloedmarker. Het meten van deze type 2 monocytten is dan mogelijk een reflectie van het lokale afweersysteem en kan van belang zijn voor de prognose van de patiënt.

## Discussie en toekomstperspectieven

In **hoofdstuk 8** worden de bevindingen van dit proefschrift samengevat en worden mogelijke combinaties van immunotherapieën en toekomstige onderzoeksmogelijkheden uitgelicht. Een succesvolle (combinatie van) immunotherapie resulteert zowel lokaal als systemisch in: adequate T-cel activatie, een toename van effector T-cellen, weinig regulatoire T-cellen en het creëren van een IFN $\gamma$  geassocieerde afweerreactie. In deze omstandigheden kan het afweersysteem zijn functie optimaal uitoefenen en de HPV infectie en de afwijking opruimen.

Lokale imiquimod therapie is in staat om het afweersysteem in de uVIN afwijking gunstig te beïnvloeden. Imiquimod resulteert in meer CD8+ cytotoxische T-cellen, minder regulatoire T-cellen, minder macrofagen en minder immature dendritische cellen. Het (deels) verdwijnen van uVIN na imiquimod is niet gerelateerd aan de van te voren aanwezige afweercellen in de afwijking. Dit betekent dat imiquimod een krachtige activator is van het lokale afweersysteem. Imiquimod heeft geen effect op de algehele HPV specifieke afweerreactie in het bloed. Systemische immunotherapie, met name HPV 16 SLP vaccinatie, resulteert wel in sterke systemische HPV specifieke T-cel responsen die geassocieerd zijn met het (deels) verdwijnen van uVIN. In de uVIN afwijking heeft systemische immunotherapie daarentegen weer weinig invloed op het lokale afweersysteem. Het verdwijnen van de uVIN afwijking na systemische immunotherapie is geassocieerd met de van te voren aanwezige afweer cellen. De combinatie van lokale en systemische immunotherapie combineert mogelijk het beste uit twee werelden: activatie van zowel het lokale als het algehele HPV specifieke afweersysteem. Een studie waar patiënten therapeutisch gevaccineerd werden na lokale behandeling met imiquimod liet inderdaad zien dat bij meer vrouwen de uVIN afwijking (deels) verdween.

De verbetering in uitkomst lijkt met name te zitten in het veranderen van het lokale afweer milieu waar de T-cellen hun functie moeten uitoefenen. Er treden al sterke systemische reacties op na therapeutische HPV vaccinatie, ook zonder het aanbrengen van imiquimod. Patiënten met een bij voorbaat gunstig afweer milieu, zoals aangetoond in dit proefschrift, met reversibele HLA klasse I expressie, veel CD8+ cytotoxische T-cellen, weinig regulatoire T-cellen en weinig tot geen macrofagen, zullen naar alle waarschijnlijkheid goed reageren op immunotherapie. uVIN patiënten die geen gunstige Ausgangssituatie hebben voorafgaand aan immunotherapie, zijn mogelijk meer gelijk aan HPV geïnduceerde schaamlipkankers. Bij deze groep patiënten zullen de verschillende aspecten van het falen van het afweer systeem aangepakt moeten worden om wel resultaat te boeken. Naast een combinatie van therapeutische vaccinatie met lokaal imiquimod kan ook gedacht worden aan vermindering van regulatoire T-cellen of macrofagen.

De karakteristieken van afweercellen, aanwezig in uVIN voorafgaand aan immunotherapie, kunnen mogelijk dienen als biomarkers in de individuele patiënt. Deze biomarkers kunnen dan idealiter een reactie op therapie voorspellen. Op deze manier zorg je er voor dat onnodige bijwerkingen van immunotherapie en de eventuele ontwikkeling van schaamlipkanker in de periode van immunotherapie kunnen worden voorkomen.

De kennis van de afweercellen die een rol spelen in uVIN en de progressie die geboekt is in het veld van immunotherapie voor uVIN, maakt dat we nu weten dat deze uVIN afwijkingen in staat zijn om te verdwijnen bij de juiste activatie van het afweersysteem. Deze kennis vormt een basis om in de toekomst verder te gaan met verbetering van immunotherapieën en geeft wellicht de mogelijkheid om therapieën te individualiseren voor de patiënten op basis van de aanwezige afweercellen.

