



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Targeting stromal interactions in the pro-metastatic tumor microenvironment : Endoglin & TGF-beta as (un)usual suspects

Paauwe, M.

Citation

Paauwe, M. (2017, February 9). *Targeting stromal interactions in the pro-metastatic tumor microenvironment : Endoglin & TGF-beta as (un)usual suspects*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/45876>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/45876>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/45876> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Paauwe, M.

Title: Targeting stromal interactions in the pro-metastatic tumor microenvironment : Endoglin & TGF-beta as (un)usual suspects

Issue Date: 2017-02-09

Chapter 10

Nederlandse samenvatting voor niet-ingewijden

1. Algemene introductie

Ondanks de grote vooruitgang in de afgelopen decennia, is kanker nog steeds een van de belangrijkste doodsoorzaken in de Westerse wereld. Bij de meeste vormen van kanker is niet de primaire tumor, maar de vorming van uitzaaiingen (metastases) de voornaamste oorzaak van patiëntensterfte. Dat is ook het geval in borst- en dikke darmkanker. Voor deze twee vormen van kanker wordt op basis van risico inschatting bepaald of patiënten baat hebben bij aanvullende anti-kanker therapieën. De beslissing hierover wordt in het huidige systeem voornamelijk gebaseerd op de stadiëring van de primaire tumor. Hierbij wordt bekeken of de tumor ingroeit in het gezonde weefsel en of de tumor al is uitgezaaid en zo ja, hoe ver. Voor zowel borst- als darmkanker geldt dat patiënten die zich presenteren zonder uitzaaiingen, niet gezien worden als risicogroep voor het ontwikkelen van uitzaaiingen. Op basis hiervan ondergaan deze patiënten alleen chirurgische verwijdering van de tumor en geen aanvullende behandelingen. Ondanks de hoge overlevingskans in deze patiëntengroep is er een gedeelte van de patiënten (~30%) dat uiteindelijk toch uitzaaiingen krijgt en hieraan zelfs overlijdt. Dit benadrukt dat er een betere selectie nodig is om deze patiënten te identificeren en om uitzaaiingen te voorkomen en behandelen.

2. Tumor micro-omgeving

De basis voor iedere tumor ligt in het optreden van veranderingen in het DNA (genetische mutaties) in lichaamscellen, waardoor deze cellen ongeremd kunnen vermenigvuldigen en de groei zelfs gestimuleerd wordt. De ontregeling, van deze normaal strak gereguleerde processen, leidt uiteindelijk tot tumorvorming. Sinds men weet dat genetische mutaties de basis zijn voor tumorgroei zijn er veel behandelingen ontwikkeld die gericht zijn op het aanvallen van de kankercellen. Doordat de mutaties in tumorcellen continu en op hoge snelheid optreden gedurende het groeien van de tumor worden veel tumoren snel ongevoelig (resistent) tegen deze behandelingen. Dit leidt vervolgens tot hernieuwde groei van de tumor, vaak een verminderde kwaliteit van leven of uiteindelijk zelfs overlijden. Meer recentelijk is gebleken dat de directe omgeving van de tumorcellen, de tumor micro-omgeving (TME), erg belangrijk is voor tumorgroei en de vorming van uitzaaiingen. Deze micro-omgeving bestaat uit cellen die de tumor ondersteunen, waaronder cellen die bloedvaten vormen zodat de tumor genoeg zuurstof en voedingsstoffen ontvangt. Andere belangrijke cellen in deze omgeving zijn ontstekingscellen en de steuncellen van de tumor, kanker geassocieerde fibroblasten (CAFs) genaamd. In zowel darm- als borstkanker is aangetoond dat de totale omvang van deze tumor micro-omgeving, die per tumor verschilt, een voorspellende factor is voor de overlevingskans van de patiënten hoe meer cellen in de micro-omgeving, hoe groter de kans op overlijden. Sinds het identificeren van de stimulerende rol van de micro-omgeving in tumorprogressie en de van vorming

uitzaaiingen zijn er therapeutische strategieën ontwikkeld gericht tegen de tumor micro-omgeving.

Cellen kunnen onderling met elkaar communiceren door middel van signaleringsroutes. Dit houdt in dat wanneer de ene cel een signaal geeft, dat wordt doorgegeven door middel van deze signaleringsroutes naar een andere cel. Een van de signaleringsroutes die een belangrijke rol speelt in alle componenten van de micro-omgeving is de Transforming Growth Factor- β (TGF- β) route. Door deze prominente rol wordt de TGF- β signalering gezien als een goed aangrijpingspunt voor behandelingen tegen kanker.

De TGF- β signaleringsroute is van essentieel belang tijdens de ontwikkeling en gedurende het normaal functioneren van het menselijk lichaam. Zoals gezegd speelt TGF- β ook een belangrijke rol in kanker. Waar TGF- β initieel tumorgroei remt, functioneert het in verder gevorderde tumoren juist als een stimulerende factor. TGF- β is een van de vele factoren uit de TGF- β familie, waar ook Bone Morphogenic Proteins (BMPs) deel van uitmaken. Om signalen van de ene naar de andere cel op een juiste manier door te geven, is een geavanceerd systeem noodzakelijk. Dit systeem is het beste te vergelijken met het kinderspeelgoed waar een specifieke gevormde blokken alleen door een specifiek gat door het deksel passen. Wanneer het blokje (signaleringsfactor) niet past op het gat (een receptor), zal het niet door het deksel passen en dus geen signaal door kunnen geven aan de ontvangende cel. De factoren uit de TGF- β signaleringsfamilie (blokjes) hebben allemaal een specifieke vorm en maken daarom gebruik van specifieke receptoren op de cellen (gaatjes in het deksel) om hun functie uit te oefenen. Wanneer een cel een benodigde receptor niet heeft, zal deze dus geen signalen kunnen ontvangen via die specifieke factor. De voor dit proefschrift belangrijke receptoren (gaten in het deksel) voor TGF- β en BMP signalering zijn ALK1 (onderzocht in **hoofdstuk 4**) en endoglin (onderzocht in **hoofdstuk 5, 7 en 8**). Beide receptoren kunnen binden aan familieleden van de TGF- β signaleringsfamilie, maar hebben specificiteit voor andere signaleringsfactoren (blokjes). De aan- of afwezigheid van deze receptoren op een cel stuurt het effect van de signaleringsfactoren in een bepaalde richting. Zo is bijvoorbeeld de aanwezigheid van endoglin op bloedvatcellen betrokken bij het sturen van TGF- β signalering in de richting van bloedvatformatie (angiogenese). Wanneer endoglin niet aanwezig is op de bloedvatcellen zal TGF- β signalering leiden tot remming van bloedvatformatie. Naast de aanwezigheid van endoglin op bloedvatcellen, is endoglin ook aangetoond op specifieke tumorcellen, sommige ontstekingscellen en op CAFs (**hoofdstuk 7**). De functies die endoglin in deze cellen vervult zijn cel-specifiek. Omdat zowel endoglin als ALK1 veel voorkomen op bloedvatcellen is er veel onderzoek gedaan naar het gebruiken van deze receptoren om bloedvatvorming in tumoren te remmen. Deze strategieën worden ook klinisch toegepast voor de behandeling van verschillende vormen van kanker. Dit proefschrift richt zich op de rol van TGF- β en BMP signalering in de tumor micro-omgeving tijdens tumor progressie en uitzaaiing. Daarnaast wordt de mogelijkheid onderzocht om de signalering via ALK1 of endoglin te onderbreken voor potentieel gebruik als behandeling tegen kanker.

3. Resultaten

In **hoofdstuk 3**, een samenvatting van 161 eerder gepubliceerde artikelen, wordt de potentie van de receptor endoglin als aangrijpingspunt voor kankerbehandelingen uitgebreid besproken. Doordat endoglin in grote hoeveelheden aanwezig is op nieuwgevormde bloedvaten, zoals dat in een tumor gebeurt en verder op weinig andere plekken in een gezond lichaam, maakt het een zeer geschikt aangrijpingspunt om deze bloedvaten aan te vallen. Daarnaast zorgt de lokalisatie van endoglin, aan de binnenkant van de bloedvaten, ervoor dat de receptor gemakkelijk toegankelijk is voor medicatie toegediend via bloed. Een voorbeeld van zulke medicatie is het toedienen van antilichamen. Wanneer we de vergelijking met de blokkendoos doortrekken zijn antilichamen stoffen die binden aan de receptor (het gat in de deksel) of de signaleringsfactor (het blokje) waardoor het blokje niet meer door het gat in de deksel past. Hierdoor zal de geïnitieerde communicatie geen doorgang kunnen vinden en wordt het beoogde effect niet bereikt. Naast behandelen, is ook de beeldvorming van een tumor van groot klinisch belang en kan deze techniek helpen bij complete chirurgische verwijdering. Hierdoor vermindert het risico op terugkeer van de tumor en het ontstaan van uitzaaiingen. Het gebruik van een oplichtend antilichaam dat bindt aan endoglin kan, door de specifieke expressie, helpen om op een efficiënte manier de tumor in beeld te brengen. Endoglin werkt in de signalering vaak samen met ALK1, een andere TGF- β receptor. De mogelijkheid om ALK1 te gebruiken als aangrijpingspunt om bloedvatgroei in tumoren te remmen, werd onderzocht in **hoofdstuk 4**. Deze studie beschrijft dat het remmen van ALK1 signalering met een antilichaam resulteerde in verminderde tumorbloedvatgroei in muismodellen voor verschillende vormen van kanker. Door het remmen van de bloedvatgroei verbeterde de kwaliteit van de resterende tumorbloedvaten. Hierdoor beschikte de tumoren nog steeds over genoeg zuurstof en voedingsstoffen waardoor de grootte van de tumoren niet werd beïnvloed. Deze verbeterde bloedvatkwaliteit en bloedtoevoer kan zorgen voor een betere bereikbaarheid van de tumor voor via het bloed toegediende chemotherapie. Het remmen van ALK1 in combinatie met chemotherapie zorgde voor verminderde tumorgroei in de diverse, in dit hoofdstuk onderzochte kankersoorten (borstkanker, hoofd- en halstumoren en huidkanker). Deze combinatietherapie wordt momenteel verder onderzocht in het laboratorium, maar ook in de kliniek. De effecten van het remmen van endoglin signalering op bloedvatgroei in borstkanker worden besproken in **hoofdstuk 5**. In deze studie werd onderzocht of het gelijktijdig remmen van twee signaleringsfactoren die bloedvatgroei stimuleren, VEGF en endoglin, zou leiden tot verminderde borsttumorgroei. In zowel celweekexperimenten als in zebrafissen was de gecombineerde behandeling efficiënter in het remmen van bloedvatgroei dan beide behandelstrategieën apart. In een muismodel voor borstkanker verminderde de combinatie behandeling de hoeveelheid tumorbloedvaten, maar de tumorgrootte veranderde niet. Opvallend genoeg was het aantal uitzaaiingen sterk verminderd na behandeling met een antilichaam tegen endoglin, TRC105 genaamd. Dit was een

zeer belangrijke bevinding voor het bestrijden van uitzaaiingen, ook in de kliniek. Opvallend was dat naast het effect op de bloedvaten van de tumor ook het aantal CAFs, de steuncellen, in de tumoren waren verminderd na anti-endoglin behandeling. De aanwezigheid van een grote hoeveelheid CAFs in de tumor is in patiënten gerelateerd aan een ernstiger ziekteverloop. Tezamen duiden deze resultaten erop dat het remmen van endoglin zowel tumor bloedvatvorming als CAFs remt en op deze manier een groot effect heeft op het uitzaaien van borstkanker. Deze resultaten werden verder onderzocht in de studies beschreven in **hoofdstuk 6 en 7**.

In **hoofdstuk 6** werd de stimulerende rol van CAFs in het ingroeien van tumorcellen in het omliggende gezonde weefsel aangetoond. Wanneer CAFs in celkweekexperimenten behandeld werden met stoffen die uitgescheiden worden door tumorcellen, zogenaamd geconditioneerd medium, leidde dit tot meer TGF- β signalering in de CAFs en hyperactivatie van CAFs. Deze twee processen spelen een belangrijke rol in de ingroei van tumorcellen in het gezonde weefsel en tijdens de vorming van uitzaaiingen. Samenvattend leidde de interactie tussen tumorcellen en CAFs tot een TGF- β afhankelijke signalering in een zichzelf versterkende vicieuze cirkel, die stimulerend werkte voor tumorgroei en –progressie. Het aanwezig zijn van endoglin op CAFs en de rol op deze cellen in darmkanker wordt beschreven in **hoofdstuk 7**. In dit hoofdstuk werd aangetoond dat naast endotheelcellen ook specifieke CAFs in het gedeelte waar de tumor het gezonde weefsel binnendringt endoglin hebben. Deze endoglin-positieve CAFs werden ook teruggevonden in uitzaaiingen van darmkanker, zowel in lymfeklieren als in uitzaaiingen in de lever. Dit wijst erop dat CAFs die signalen kunnen ontvangen via endoglin een stimulerende rol spelen in de vorming van uitzaaiingen. Daarnaast bleek het aanwezig zijn van endoglin op CAFs in vroeg stadium darmkankerpatiënten, met een laag risico op uitzaaiingen, voorspellend te zijn voor het uitzaaien van de tumor. Hierdoor zouden deze “hoog risico” patiënten beter geïdentificeerd kunnen worden. In muizen met uitzaaiende darmkanker verminderde het aantal uitzaaiingen in de lever wanneer signalering via endoglin geremd werd. Deze resultaten wijzen op een belangrijke rol voor endoglin op CAFs in het proces van darmkankeruitzaaiing. De remming van signalering via endoglin op CAFs zou een aangrijpingspunt kunnen bieden voor nieuwe behandelingen.

Omdat endoglin op CAFs een belangrijke rol lijkt te spelen in darmkankeruitzaaiing werd een muis gegenereerd waarin, op ieder gewenst moment, endoglin uitgeschakeld kan worden specifiek in de CAFs. Wanneer we weer naar de vergelijking kijken met de blokkendoos, zorgt dit er voor dat het gat in de deksel (endoglin) helemaal verdwijnt. Hierdoor kunnen de blokken die hier normaal doorheen passen niet meer in de doos terecht komen en dus geen signaal doorgeven. Na het uitschakelen van endoglin werd in deze muizen darmkanker veroorzaakt. Vervolgens werd onderzocht of CAF-specifieke uitschakeling van endoglin een effect heeft op tumorvorming en uitzaaiingen, zoals beschreven in **hoofdstuk 8**. Tot onze verbazing ontstonden er in muizen waarin endoglin was uitgeschakeld meer vroeg stadium tumoren (adenomen) dan in controledieren. Wanneer de tumoren gedetailleerd onderzocht werden, bleek dat er meer CAFs aanwezig

waren wanneer endoglin uitgeschakeld was. Daarnaast, was ook de aanwezigheid van twee typen ontstekingscellen toegenomen na endoglin uitschakeling.

Meer gedetailleerde experimenten lieten zien dat na het uitschakelen van endoglin, meer factoren worden gemaakt die ontstekingscellen aantrekken. Deze verandering zou een verklaring kunnen zijn van de verhoogde aanwezigheid van ontstekingscellen in de tumoren. Ontstekingscellen spelen een grote rol in het ontstaan van tumoren en hun verdere groei, zowel stimulerend als remmend. Gebaseerd op deze data is het noodzakelijk verdere studies te doen naar de rol van endoglin op de steuncellen van de tumor, de CAFs, in het aantrekken van ontstekingscellen.

4. Conclusies

De studies in dit proefschrift bevestigen de uitgebreide interactie tussen verschillende celtypen in de tumor micro-omgeving en hoe deze interacties klinisch relevant kunnen zijn voor het ontwikkelen van nieuwe kankerbehandelingen. Het gebruiken van de receptoren ALK1 of endoglin op bloedvaten als aangrijpingspunt voor behandelingen kan leiden tot een verbeterde efficiëntie van bestaande chemotherapie. Daarnaast spelen CAFs een belangrijke rol in tumorgroei en -uitzaaiing en lijkt de aanwezigheid van endoglin op deze cellen daar een sleutelrol in te spelen. Als laatste leidt de uitschakeling van endoglin op CAFs tot een toename van het aantal tumoren in een muismodel voor darmkanker. Deze tumoren laten zowel een verhoogd percentage CAFs zien als een verhoogde aanwezigheid van ontstekingscellen.

5. Klinische relevantie

Uit de in dit proefschrift beschreven studies blijkt dat TGF- β signalering in de tumor micro-omgeving een belangrijke rol speelt in tumorgroei en uitzaaiing. Het remmen van deze signalering lijkt efficiënt bereikt te kunnen worden door ALK1 of endoglin als aangrijpingspunt te gebruiken. Het remmen van ALK1 signalering wordt in kankerpatiënten onderzocht om bloedvaten in de tumor aan te vallen. Daarnaast wordt de therapeutische remming van ALK1 signalering in combinatie met chemotherapie ook in klinische studies bestudeerd. Het gebruik van het anti-endoglin antilichaam TRC105 wordt momenteel beoordeeld in klinische studies. Hierin wordt gekeken naar het effect op tumorbloedvatgroei en de mogelijke combinatie met chemotherapie.

