

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20399> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Speetjens, Frank

Title: Anti-colorectal cancer immunity: control 'the force'!

Date: 2013-01-10

Chapter 9

Nederlandse samenvatting

List of Publications

Curriculum Vitae

Dankwoord

SAMENVATTING

Een van de meest unieke kenmerken van het afweersysteem bestaat uit het vermogen om specifieke doelen te herkennen en deze eventueel te vernietigen. Er is uitgebreide discussie of tumorcellen een doel vormen voor het afweersysteem en vervolgens of het afweersysteem gebruikt kan worden om tumorcellen te vernietigen. In dit proefschrift werd de interactie tussen het afweersysteem en dikkedarm- / rectumkanker onderzocht met als uiteindelijk doel T-cel gemedieerde immunotherapie van colorectale tumoren verder te ontwikkelen.

In **hoofdstuk 2** werd de klinische impact van (verminderde) expressie van Humaan Leukocyten Antigeen (HLA) klasse I onderzocht voor patiënten behandeld aan rectumkanker. HLA klasse I moleculen presenteren antigenen aan cytotoxische T lymfocyten (CTL). Hierdoor kunnen CTL, cellen herkennen die een bedreiging vormen voor het lichaam om ze daarna eventueel vernietigen. Verminderde expressie van HLA klasse I op tumorcellen maakt het mogelijk dat tumorcellen kunnen ontsnappen aan de CTL. Eerdere studies toonden dat verminderde expressie, in het bijzonder volledige afschakeling van HLA klasse I moleculen in dikkedarm- en rectumkanker geassocieerd is met een betere overleving van de patiënt. Echter, het lijkt erop dat volledige afschakeling van HLA klasse I expressie in colorectale tumoren voornamelijk voorkomt in tumoren met een hoge graad van microsatellietinstabiliteit (MSI-H). Patiënten met een MSI-H tumor zouden een betere overleving hebben t.o.v. patiënten met een microsatellietstabiele (MSS) tumor. In eerdere studies naar het prognostische effect van HLA klasse I afschakeling, werden patiëntcohorten gebruikt welke bestonden uit patiënten geopereerd aan dikkedarm- of rectumkanker zonder onderscheid te maken tussen MSS en MSI-H tumoren. Omdat in deze studies niet gecorrigeerd werd voor de prognostische impact van microsatelliet-instabiliteit, kunnen de statistische berekeningen dus tot een onzuivere schatting van het overlevingsvoordeel van patiënten met HLA klasse I afgeschakelde tumoren hebben geleid. Zoals in hoofdstuk 2 wordt aangetoond, bestaan rectumtumoren bijna geheel uit MSS tumoren. Onze resultaten tonen dat afschakeling van HLA klasse I expressie in rectumtumoren is geassocieerd met onafhankelijk slechtere overleving van rectumkankerpatiënten. Volledige afschakeling van HLA klasse I werd nauwelijks teruggevonden in rectumtumoren. Deze resultaten suggereren dat afschakeling van HLA klasse I een manier is voor tumorcellen om aan CTL-gemedieerde immuniteit te ontsnappen.

In **hoofdstuk 3** werd de infiltratie van natural-killer (NK) cellen in dikkedarmtumoren bestudeerd. De HLA klasse I negatieve tumorcellen kunnen een doelwit voor NK cellen vormen omdat NK cellen in staat zijn om cellen met verminderde

HLA klasse I te elimineren. Onze studie toonde aan dat er relatief weinig NK cellen dikkedarmtumoren infiltreerden. Dit gold ook voor tumoren zonder HLA klasse I expressie. NK cellen lijken dus geen rol te spelen in een tumor, maar hypothetisch kunnen zij wel een rol spelen in het bestrijden van systemische uitzaaiingen van HLA klasse I negatieve tumorcellen.

Effectieve antitumor T cel immuniteit vereist niet alleen presentatie van antigenen aan CTL, een andere voorwaarde is dat T cellen naar de tumor migreren en contact maken met de tumorcellen. Migratie van leukocyten naar en in de tumor is een gecompliceerd en slecht begrepen proces waarin chemokines een sleutelrol vervullen. In **hoofdstuk 4** werd gevonden dat lage expressie van een specifiek chemokine: CXCL5, in een rat-tumormodel, resulteerde in snelle tumorgroei en toename van het aantal van metastasen, terwijl *in vitro* geen verschil in o.a. delingssnelheid werd gevonden tussen klonen met hoge of lage expressie van CXCL5. Hoge expressie van CXCL5 bleek in twee verschillende cohorten van patiënten met colorectale kanker geassocieerd te zijn met een betere prognose. Daarnaast werd een positieve correlatie gevonden tussen expressie van CXCL5 en het aantal in de tumor gelokaliseerde CD8⁺ T cellen. Deze gegevens pleiten ervoor dat tumorcellen zelf een belangrijke rol kunnen spelen in de migratie van immuuncellen en op deze wijze de antitumorimmunreactie beïnvloeden.

In het laatste deel van het proefschrift wordt de versterking van de tumorspecifieke T cel reactie m.b.v. vaccinatie tegen vooraf gedefinieerde antigenen beschreven. Voor colorectale tumoren moet onderscheid worden gemaakt tussen MSI-H- en MSS tumoren voor immunotherapeutische doeleinden. MSI-H tumoren hebben als unieke eigenschap dat zij vele nieuwe antigenen tot expressie brengen die als lichaamsvreemd door het immuunsysteem kunnen worden gezien. De afweerreactie tegen MSS tumoren berust veel meer op het herkennen van lichaamseigen antigenen waarvoor het afweersysteem mogelijk tolerant is. Tot nu toe is T cel-gemedieerde immunotherapie geen standaardbehandeling voor colorectale kankerpatiënten. Slechts in enkele subanalyses van studies zijn er aanwijzingen dat immunotherapeutische strategieën een klinische impact kunnen hebben voor colorectale kankerpatiënten. Notabene de meeste van deze studies zijn uitgevoerd als fase I en/of fase II. Deze studies tonen wel aan dat vaccins goed in staat zijn een tegen het vaccin gerichte afweerreactie te kunnen induceren.

In **hoofdstuk 5** werd een methode beschreven om het afweeractiverende vermogen van frameshiftgemuteerde eiwitten, zoals die voorkomen in MSI-H tumoren, te voorspellen. MSI-H tumoren brengen, door mutaties in frameshifts, unieke tumorspecifieke antigenen tot expressie die als lichaamsvreemd door het immuunsysteem worden aangemerkt. Helaas is relatief weinig bekend over de capaciteit om een

afweerreactie op te wekken voor de meeste van de frameshift gemuteerde eiwitten. Wij ontwikkelden daarom een selectiemethode voor de identificatie van frameshift gemuteerde eiwitten die van belang kunnen zijn voor immunotherapeutische doeleinden. Deze methode is gebaseerd op accumulatie van eiwitten en Major Histocompatibility Complex (MHC) klasse I presentatie. Onze gegevens tonen dat 8 van de 15 frameshiftgemuteerde eiwitten onderzocht in onze studie, verder bestudeerd moeten worden. In het bijzonder 4 antigenen die zeer sterk tot expressie komen en goed gepresenteerd worden in MHC klasse I, lijken zeer relevant te zijn voor immunotherapie van kanker. Hoewel MSI-H tumoren slechts ongeveer 15% van alle colorectale tumoren omvatten, zijn patiënten met een MSI-H tumor zeer interessante vaccinatiekandidaten omdat: 1) een sterke effectieve afweerreactie wordt verwacht na vaccinatie met lichaamsvreemde antigenen; 2) colorectale kanker één van de meest voorkomende kankersoorten in de westerse wereld is; en 3) vele families met genetische belasting voor het Lynchsyndroom, die bijna allemaal MSI-H tumoren krijgen, zijn geïdentificeerd. De laatstgenoemde groep zou profylactisch gevaccineerd kunnen worden om uitgroei van MSI-H tumoren te voorkomen.

In **hoofdstuk 6** werd van een p53 synthetische lange peptide (p53-SLP®) vaccin de veiligheid en de capaciteit om een afweerreactie op te roepen onderzocht bij patiënten behandeld aan gemetastaseerd colorectaal kanker. Het vaccin bleek veilig en zeer immunogeen te zijn. Voornamelijk p53-specifieke CD4⁺ T cellen werden geactiveerd m.b.v. het vaccin. Het ontbreken van p53-specifieke CD8⁺ T cellen, lijkt resultaten van eerdere studies te bevestigen die suggereren dat het p53-specifieke CD8⁺ T cel repertoire ernstig verstoord is door tolerantie van het afweersysteem voor lichaamseigen eiwitten. IFN- γ producerende CD4⁺ Th1 cellen spelen een belangrijke rol in het coördineren en ondersteunen van de lokale afweerreactie door CD8⁺ CTL en andere immuuncellen. Helaas blijkt de totale productie van cytokinen zoals IFN- γ door de p53-SLP® vaccin geactiveerde T cel populatie in onze studie erg klein te zijn. In **hoofdstuk 7** werd daarom bestudeerd of het combineren van p53-SLP® vaccin met Interferon-alfa (IFN- α) injecties tot een verbetering van de p53-specifieke IFN- γ productie kon leiden. Deze studie illustreert duidelijk dat toevoeging van een adjuvans zoals IFN- α injectie aan een vaccin veilig is. Tevens bleek dat toevoeging van IFN- α aan het p53-SLP® vaccin de IFN- γ geassocieerde p53-specifieke T cel reactie verbeterde.

TOT BESLUIT

Er is een duidelijke (toekomstige) rol voor tumorspecifieke T cel therapie in de behandeling van colorectale kankerpatiënten. Dit proefschrift doet verslag over de

relatie tussen het immuunsysteem en colorectale kanker op basis van zowel observationele - als interventiestudies. Het is niet waarschijnlijk dat alleen het gebruik van vaccins voor de behandeling van colorectale kanker tot het gewenste klinische effect zullen leiden. Meer waarschijnlijk is dat zij gecombineerd zullen moeten worden met immuunmodulerende modaliteiten om een effectieve antitumorreactie *in vivo* te genereren. Belangrijk hierbij zal zijn om de resultaten van observationele studies te gebruiken voor het ontwerpen van nieuwe interventiestudies met uiteindelijk doel de kracht van het immuunsysteem te controleren en in te zetten tegen colorectale tumorcellen.

LIST OF PUBLICATIONS

1. Zeestraten, E. C., **Speetjens, F. M.**, Welters, M. J., Saadatmand, S., Stynenbosch, L. F., Jongen, R., Kapiteijn, E., Gelderblom, H., Nijman, H. W., Valentijn, A. R., Oostendorp, J., Fathes, L. M., Drijfhout, J. W., van de Velde, C. J., Kuppen, P. J., van der Burg, S. H., and Melief, C. J. Addition of interferon-alpha to the p53-SLP vaccine results in increased production of interferon-gamma in vaccinated colorectal cancer patients: A phase I/II clinical trial. *Int.J.Cancer.* 5-9-2012.
2. Zeestraten, E. C., Van Hoesel, A. Q., **Speetjens, F. M.**, Menon, A. G., Putter, H., van de Velde, C. J., and Kuppen, P. J. FoxP3- and CD8-positive Infiltrating Immune Cells Together Determine Clinical Outcome in Colorectal Cancer. *Cancer Microenviron.* 6-7-2011.
3. **Speetjens, F. M.**, Zeestraten, E. C., Kuppen, P. J., Melief, C. J., and van der Burg, S. H. Colorectal cancer vaccines in clinical trials. *Expert.Rev.Vaccines.* 10(6), 899-921. 2011.
4. Edsparr, K., **Speetjens, F. M.**, Mulder-Stapel, A., Goldfarb, R. H., Basse, P. H., Lennernas, B., Kuppen, P. J., and Albertsson, P. Effects of IL-2 on MMP expression in freshly isolated human NK cells and the IL-2-independent NK cell line YT. *J.Immunother.* 33(5), 475-481. 2010.
5. de Kruijf, E. M., van Nes, J. G., Sajet, A., Tummers, Q. R., Putter, H., Osanto, S., **Speetjens, F. M.**, Smit, V. T., Liefers, G. J., van de Velde, C. J., and Kuppen, P. J. The predictive value of HLA class I tumor cell expression and presence of intratumoral Tregs for chemotherapy in patients with early breast cancer. *Clin.Cancer Res.* 16(4), 1272-1280. 15-2-2010.
6. **Speetjens, F. M.** and Kuppen, P. J. Comment re: Intratumoral immune reaction in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 70(4), 1741. 15-2-2010.
7. Edsparr, K., Johansson, B. R., Goldfarb, R. H., Basse, P. H., Nannmark, U., **Speetjens, F. M.**, Kuppen, P. J., Lennernas, B., and Albertsson, P. Human NK cell lines migrate differentially *in vitro* related to matrix interaction and MMP expression. *Immunol.Cell Biol.* 87(6), 489-495. 2009.
8. Doekhie, F. S., Morreau, H., de Bock, G. H., **Speetjens, F. M.**, Dekker-Ensink, N. G., Putter, H., van de Velde, C. J., Tollenaar, R. A., and Kuppen, P. J. Sialyl Lewis X expression and lymphatic microvessel density in primary tumors of node-negative colorectal cancer patients predict disease recurrence. *Cancer Microenviron.* 1(1), 141-151. 2008.
9. **Speetjens, F. M.**, Liefers, G. J., Korbee, C. J., Mesker, W. E., van de Velde, C. J., van Vlierberghe, R. L., Morreau, H., Tollenaar, R. A., and Kuppen, P. J. Nuclear localization of CXCR4 determines prognosis for colorectal cancer patients. *Cancer Microenviron.* 2(1), 1-7. 2009.
10. **Speetjens, F. M.**, Kuppen, P. J., Welters, M. J., Essahsah, F., Voet van den Brink AM, Lantrua, M. G., Valentijn, A. R., Oostendorp, J., Fathes, L. M., Nijman, H. W., Drijfhout, J. W., van de Velde, C. J., Melief, C. J., and van der Burg, S. H. Induction of p53-specific immunity by a p53 synthetic long peptide vaccine in patients treated for metastatic colorectal cancer. *Clin.Cancer Res.* 15(3), 1086-1095. 1-2-2009.
11. **Speetjens, F. M.**, Kuppen, P. J., Morreau, H., and van der Burg, S. H. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology.* 135(2), 711-712. 2008.
12. **Speetjens, F. M.**, Lauwen, M. M., Franken, K. L., Janssen-van Rhijn, C. M., van Duikeren S., Bres, S. A., van de Velde, C. J., Melief, C. J., Kuppen, P. J., van der Burg, S. H., Morreau, H., and Offringa, R. Prediction of the immunogenic potential of frameshift-mutated antigens in mic-

rosatellite instable cancer. *Int.J.Cancer*. 123(4), 838-845. 15-8-2008.

13. **Speetjens, F. M.**, Kuppen, P. J., Sandel, M. H., Menon, A. G., Burg, D., van de Velde, C. J., Tollenaar, R. A., de Bont, H. J., and Nagelkerke, J. F. Disrupted expression of CXCL5 in colorectal cancer is associated with rapid tumor formation in rats and poor prognosis in patients. *Clin.Cancer Res.* 14(8), 2276-2284. 15-4-2008.
14. **Speetjens, F. M.**, de Bruin, E. C., Moreau, H., Zeestraten, E. C., Putter, H., van Krieken, J. H., van Buren, M. M., van Velzen M., Dekker-Ensink, N. G., van de Velde, C. J., and Kuppen, P. J. Clinical impact of HLA class I expression in rectal cancer. *Cancer Immunol.Immunother.* 57(5), 601-609. 2008.
15. De, Heer P., Sandel, M. H., **Speetjens, F. M.**, Koudijs, M. M., Putter, H., Ensink, G. N., van de Velde, C. J., and Kuppen, P. J. Cutaneous and intra-abdominal abscess formation in rats following radio frequency ablation of liver tumors in combination with celecoxib treatment. *In Vivo.* 20(3), 373-375. 2006.
16. Sandel, M. H., **Speetjens, F. M.**, Menon, A. G., Albertsson, P. A., Basse, P. H., Hokland, M., Nagelkerke, J. F., Tollenaar, R. A., van de Velde, C. J., and Kuppen, P. J. Natural killer cells infiltrating colorectal cancer and MHC class I expression. *Mol. Immunol.* 42(4), 541-546. 2005.
17. van der Eb, M. M., Pietersen, A. M., **Speetjens, F. M.**, Kuppen, P. J., van de Velde, C. J., Noteborn, M. H., and Hoeben, R. C. Gene therapy with apoptin induces regression of xenografted human hepatomas. *Cancer Gene Ther.* 9(1), 53-61. 2002.

CURRICULUM VITAE

The author of this thesis was born on October 3, 1976 in The Hague, the Netherlands. After graduating Athenaeum high school at the Aloysius College in The Hague, he started to study Biomedical Sciences at the Leiden University in 1995. He performed research for his master's thesis at the departments of Molecular Biology and Immunology at University North Texas Health Science Center, Fort Worth, Texas, USA and at department of surgical oncology at the Leiden University Medical Center, under supervision of respectively Prof. dr. R.H. Goldfarb and dr. P.J.K. Kuppen and graduated in 2002. From 1998 he started medical school at the same university. After receiving his medical degree in 2003, he worked as a surgical resident at the Diaconessenhuis, Leiden. In 2005 he started his PhD research project that resulted in the current thesis at the department of surgical oncology at the Leiden University Medical Center, under supervision of prof. dr. C.J.H. van de Velde, dr. P.J.K. Kuppen and prof. dr. S.H. van der Burg. In 2008 he obtained a grant from The Netherlands' Organization for Health Research and Development (NWO-AGIKO stipendium), enabling him to combine his research activities with his residency training in internal medicine at Rijnland Hospital, Leiderdorp (Dr. M.J. Janssen) and Leiden University Medical Center (prof. dr. J.T. van Dissel). The author of this thesis is living together with Irene C. Notting and has two children: Friso and Loek.

DANKWOORD

Nu mijn proefschrift klaar is, wil ik graag iedereen bedanken die in al die jaren een bijdrage heeft geleverd. Op de eerste plaats bedank ik alle patiënten die aan een van de onderzoeken hebben deelgenomen. Ten tweede bedank ik alle co-auteurs voor de hulp bij het opzetten en uitvoeren van experimenten, analyseren en interpreteren van de data, discussiëren en het schrijven van de manuscripten. In het bijzonder bedank ik de volgende personen:

Professor van de Velde, het was een eer om in uw laboratorium onderzoek te mogen uitvoeren. Peter Kuppen, met jouw enorme enthousiasme, was ik al snel overgehaald om bij jou onderzoek te gaan doen. Je nam altijd de tijd om te discussiëren over onderzoeksideeën, heel erg bedankt voor alles. Sjoerd van der Burg, het was prettig samenwerken, je had vaak originele ideeën en wist nieuwe invalshoeken te geven aan dit onderzoek. Professor Melief en Rienk Offringa de gezamenlijke discussies over tumorimmunologie waren altijd nuttig. Rienk dank voor een interessante wending die je hebt gegeven aan mijn onderzoek waar eigenlijk nog een vervolgstudie op moet komen!

Alle wetenschappers, laboranten, artsen, verpleegkundigen, secretaresses verbonden aan het chirurgische oncologische laboratorium dank ik voor de hulp bij dit onderzoek. In het bijzonder Geeske, Connie, Ronald, Rob, Gaby en Tamara bedankt voor de hulp bij de vele experimenten en voor een gezellige periode in het lab. Graziella en Annemarie, jullie waren de link met de kliniek; dankzij jullie verliep de vaccinatiestudie uitermate soepel en was het prettig samenwerken. Mijn medepromovendi waaronder Pieter, Eliane, Esther, Maro, Fania, Michiel, Martijn en Jan-Willem bedankt voor een mooie tijd.

Dit proefschrift is tot stand gekomen op basis van samenwerking met veel andere afdelingen waaronder de afdelingen: pathologie, klinische oncologie, immuno hematologie en bloedtransfusie, toxicologie, datacenter, endocrinologie, moleculaire celbiologie, apotheek, proefdierverzorgers. In het bijzonder gaat daarom ook mijn dank uit naar Marije Schoenmaekers-Welters, Marjolein Lauwen, Elza de Bruin, Jan Willem Dierssen, Sandra Bres, Fred Nagelkerke en Hans de Bont voor de samenwerking bij de verschillende studies.

Sander, van oud-huisgenoot tot paranimf is een lange mooie tijd geweest. Bedankt voor je vriendschap en de gezelligheid door de jaren. Roy, ook al zien we elkaar de laatste jaren te weinig, onze studententijd was een prachttijd! Bart, dat we nog vele avonden gezellig een biertje mogen drinken en nog vele mannenweken samen zullen skiën. Mark, nu paranimf maar gedurende het grootste gedeelte van mijn leven mijn grote steun. Jij staat altijd klaar als ik/wij hulp nodig hebben, bedankt. Mijn ouders, dit boekje is jullie resultaat, bedankt voor alle steun en vertrouwen.

En last but not least, Irene, ik ben je ontzettend dankbaar voor je geduld, je liefde en je support in de afgelopen jaren; samen met jou is het leven mooi. De mannetjes, Friso en Loek, jullie zijn fantastisch.