

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22975> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Pahl, Jens Heinz-Werner

Title: Innate immune responses of natural killer cells and macrophages against bone sarcomas : towards cellular immunotherapy

Issue Date: 2014-01-09

SAMENVATTING VAN HET PROEFSCHRIFT

Inleiding

Osteosarcoom en Ewing-sarcoom zijn de meest voorkomende kwaadaardige bontumoren bij kinderen en jong volwassenen. Ondanks chirurgische verwijdering van de tumor in combinatie met hoge dosis combinatie chemotherapie, zal een derde van de patiënten recidiveren waarna de prognose slecht is. Ook patiënten met gemetastaseerde tumoren of tumoren die niet reageren op chemotherapie, hebben slechte overlevingskansen. Nieuwe behandelmethoden, die specifiek tegen de tumorcellen maar niet tegen gezonde weefsels gericht zijn, dienen ontwikkeld te worden. In eerder onderzoek was aangetoond, dat Natural Killer (NK) cellen en macrofagen, beide behorende tot het specifieke immuunsysteem, anti-tumor activiteit bezitten tegen osteosarcoom en Ewing-sarcoom cellen. NK-cellen zijn in staat virus-geïnficeerde cellen en kankercellen te lyseren. Daarnaast kunnen NK-cellen de activatie van het specifieke immuunsysteem ondersteunen. Tumorcellen ontsnappen soms aan herkenning door cytotoxische T-lymfocyten door de expressie van MHC klasse I moleculen te verlagen. NK-cellen daarentegen herkennen juist cellen die geen of weinig MHC klasse I tot expressie brengen. Omdat er tot op heden nog geen relatie tussen NK-cel therapie en klinisch ongunstige effecten zoals graft-versus-host ziekte en toxiciteit is gerapporteerd, zijn NK-cellen een aantrekkelijke optie om immunotherapie op te baseren.

Voor een effectieve immunotherapie is het verder nog noodzakelijk dat de effector cellen ongevoelig zijn voor de immuun-onderdrukkende eigenschappen van de tumor. Zowel de tumor cellen zelf als het stromale weefsel rondom de tumor kunnen de effector cellen onderdrukken of ontsnappen aan herkenning.

In het **inleidende hoofdstuk 1** worden de klinische en biologische kenmerken van het osteosarcoom en Ewing-sarcoom besproken. Aansluitend volgt er een overzicht waarin het veld van de tumorimmunologie en de verschillende immunotherapieën wordt beschreven. De resultaten van de preklinische studies, beschreven in de **hoofdstukken 2–6**, worden in het **afsluitende hoofdstuk 7** samengevat, met daarbij de implicaties voor immunotherapieën die op NK-cellen en macrofagen gebaseerd zijn.

Resultaten

In **hoofdstuk 2** wordt een experimenteel model behandeld om de activiteit van NK-cellen te meten, gestimuleerd door twee verschillende serotypen van het adenovirus. Wanneer bloedcellen geïnficeerd werden met humaan adenovirus type 5 (HAdV5), was zowel de verhoogde expressie van de NK-cel activatie marker CD69 als de hogere cytotoxische activiteit van NK-cellen, afhankelijk van T-cellen en met name hun interleukine-2 productie. NK-cellen gestimuleerd door infectie van bloedcellen door een ander serotype, namelijk HAdV35, werden daarentegen onafhankelijk van T-cellen geactiveerd. In dit geval werd NK-cel activatie geïnduceerd door verhoogde productie van interferon- α door plasmacytoïde dendritische cellen (pDC). De pDC herkenden het virus-DNA via hun DNA-sensor, toll-like receptor 9. Bovendien werd de interferon- α productie versterkt door de wederzijds interactie tussen pDC en NK-cellen.

In **hoofdstuk 3** is uitgezocht hoe het cytotoxische potentieel van NK-cellen tegen osteosarcoom en Ewing-sarcoom cellen versterkt en specifiek gericht kan worden. Hier wordt beschreven dat

sarcoomcellen beter herkend en gelyseerd kunnen worden door NK-cellen als de tumorcellen met therapeutische antilichamen zoals cetuximab (gericht tegen de receptor voor epidermale groei factor (EGFR)) beladen zijn. In aanwezigheid van cetuximab was de cytotoxische activiteit van NK-cellen, ook die van patiënten die een osteosarcoom hebben, significant verhoogd tegen autologe EGFR-postieve osteosarcoom cellen, dat wil zeggen tumorcelkweken die uit dezelfde patiënten gegenereerd zijn. De cytotoxiciteit van NK-cellen, gemedieerd door cetuximab, was even effectief als die van NK-cellen, die gestimuleerd waren met het sterk activerende cytokine interleukine-15 (IL-15). Zelfs bij lage hoeveelheden EGFR op de tumorcellen, was de lyserende werking van NK-cellen reeds maximaal; er werd geen dosis-effect relatie gevonden.

Op deze manier zijn NK-cellen in staat om substantiële cytotoxische activiteit tegen osteosarcoom en Ewing-sarcoom cellijnen uit te oefenen, zoals aangetoond in de korte vier uur durende chroom-release experimenten. Maar, zoals beschreven in **hoofdstuk 4**, kunnen langdurige interacties (zoals twee dagen) tussen sarcoomcellen en NK-cellen, die mogelijk bij de patiënt in het omliggende tumorweefsel plaatsvinden, de activiteit van NK-cellen tegen sarcomen verminderen. Sommige sarcoom cellijnen kunnen down regulatie van activerende receptoren zoals NKG2D, DNAM-1 en NKP30 op NK-cellen veroorzaken, zelfs in aanwezigheid van het sterk activerende cytokine IL-15. Deze lagere expressie van receptoren werd gemedieerd door fysiek contact tussen de tumorcel en de NK-cel, en had als gevolg dat de cytotoxische activiteit van NK-cellen verminderde, dus een remmend effect had op de functie van NK-cellen. Opvallend was dat de antilichaam-gemedieerde cytotoxische capaciteit van NK-cellen ongevoelig was voor de remming door sarcoomcellen. Wanneer de NK-cellen vóórdat ze in contact kwamen met de sarcoomcellen met IL-15 geactiveerd waren, was hun cytotoxische activiteit bestand tegen de remmende effecten van de tumorcellen. Een combinatie van NK-cel activatie door middel van cytokinen en toevoeging van therapeutische antilichamen zou de functionaliteit van NK cellen in patiënten zodanig kunnen versterken dat eliminatie van tumorcellen, ondanks inhiberende factoren van de tumor(omgeving), effectief blijft.

In solide tumoren is vaak infiltratie te zien van macrofagen en hoewel bij vele tumoren dit een negatieve prognostische factor is, is deze infiltratie in osteosarcoom patiënten gecorreleerd met een betere prognose. Deze observatie suggereert dat macrofagen anti-tumor activiteit tegen het osteosarcoom bezitten. In **hoofdstuk 5** wordt beschreven dat M1-type macrofagen in staat zijn de groei van osteosarcoom cellen te remmen, als deze macrofagen geactiveerd zijn met een bacteriële stimulus, zoals liposomal muramyl tripeptide (L-MTP-PE). De inductie van anti-tumor activiteit van M1-type macrofagen door L-MTP-PE was wel afhankelijk van co-stimulatie met het cytokine interferon- γ . Inductie van interferon- γ tijdens macrofaag activatie door L-MTP-PE zou dus belangrijk kunnen zijn om het effect van L-MTP-PE therapie in patiënten met osteosarcoom te verbeteren. Bovendien waren IL-10-gepolariseerde macrofagen, waarvan over het algemeen beschreven wordt dat die de tumorontwikkeling ondersteunen, in staat osteosarcoom celgroei te remmen, als het antilichaam cetuximab aanwezigheid was. De anti-tumor activiteit van tumor-infiltrerende macrofagen zou dus gestimuleerd kunnen worden door factoren die op een infectie in de kanker omgeving lijken, namelijk een bacterieel bestanddeel in een interferon- γ rijke omgeving, of door toediening van een therapeutische antilichaam.

In **hoofdstuk 6** wordt beschreven dat het immuunregulerende eiwit CD70 tot expressie gebracht wordt op een meerderheid van de osteosarcoom cellijnen en primaire osteosarcoom

celkweken. Op Ewing-sarcoom cellijnen was daarentegen nauwelijks CD70 aantoonbaar. In zowel diagnostisch als in recidief osteosarcoom weefsel is CD70-expressie heterogeen en beperkt zich tot de tumorcellen. CD27, de receptor voor CD70, werd niet gedetecteerd op tumorcellen. Infiltrerende T-cellen in tumorweefsel waren negatief voor zowel CD70 als CD27-expressie, onafhankelijk van CD70 expressie in het tumorweefsel. CD70-gen expressie was niet gecorreleerd met het ontstaan van metastasen of de overlevingskansen van osteosarcoom patiënten. Gezien het feit dat expressie van CD70 in gezond weefsel heel beperkt en transient is, zou CD70 een nieuw en tumor specifieke target kunnen zijn voor immuuntherapieën in patiënten met CD70-positieve tumoren.

Conclusies

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift illustreert dat humane NK-cellen en macrofagen in staat zijn anti-tumor activiteit ten toon te spreiden als deze immuuncellen geactiveerd zijn door de juiste stimuli of in aanwezigheid van therapeutische antilichamen. Deze resultaten kunnen helpen om de huidige therapieën te verbeteren en de ontwikkeling van nieuwe immuuntherapieën te stimuleren. Daarbij zal in het bijzonder aandacht gegeven dienen te worden aan de gevoeligheid van deze therapieën voor immuun-onderdrukkende effecten van de tumor of tumor omgeving. Om eliminatie van tumorcellen door een NK cel immunotherapie effectief te laten zijn zal in de toekomst enerzijds onderzocht dienen te worden hoe de ontsnapping van tumorcellen aan het immuunsysteem kan worden voorkomen en anderzijds hoe de migratie van NK cellen in de tumor micro-omgeving geoptimaliseerd kan worden.

