

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/24366> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Buddingh, Emilie Pauline

**Title:** Innate immunity in osteosarcoma

**Issue Date:** 2014-03-05

# 8.

Nederlandse samenvatting





Hooggradig osteosarcoom is een agressieve vorm van botkanker die voornamelijk adolescenten en jong volwassenen treft. Het is een zeldzame tumor, met afhankelijk van de leeftijd een incidentie tussen de 1.7 en 8.4 per miljoen. Ondanks behandeling met chemotherapie en operatieve verwijdering van de tumor, overlijdt dertig tot veertig procent van de patiënten aan de ziekte, meestal ten gevolge van uitzaaiingen naar de longen. In dit proefschrift werden factoren gerelateerd aan de etiologie en prognose van het hooggradige osteosarcoom onderzocht (**hoofdstuk 2 en 3**). Daarnaast werd de interactie tussen specifieke cellen van het aangeboren afweersysteem en osteosarcoom onderzocht (**hoofdstuk 4, 5 en 6**). Gezamenlijk zullen deze studies hopelijk leiden tot de ontwikkeling van therapieën die de cellen van het aangeboren afweersysteem activeren en in staat stellen de groei van tumorcellen in te perken, dan wel de tumorcellen direct of indirect te doden.

In sommige gevallen van osteosarcoom is er sprake van een genetische predispositie, bijvoorbeeld zoals in het kader van het Li-Fraumeni syndroom (ten gevolge van *TP53* mutaties) of het erfelijke retinoblastoom syndroom (ten gevolge van *RBI* mutaties). In de meeste gevallen is er echter geen erfelijke oorzaak aan te wijzen. Slechts zelden is er in het bot een pre-maligne afwijking aan te wijzen. Er zijn een aantal aanwijzingen dat mesenchymale stroma cellen (MSCs) of vroege osteoblast-precursorcellen de voorloper cellen zijn van osteosarcoomcellen. Ten eerste, vindt er in de groeischijven ten tijde van de pubertaire groeispurt een snelle celdeling en differentiatie van MSCs plaats. Het is op deze anatomische lokatie dat osteosarcoom het meest frequent ontstaat. Ten tweede is gebleken dat muizen MSCs die langdurig *in vitro* gekweekt zijn, zich kunnen ontwikkelen tot , osteosarcoom-achtige tumorcellen. Ook MSCs van apen (*Macacus cynomolgus*) ondergaan een dergelijke transformatie naar tumor-achtige cellen bij langdurig kweken. In **hoofdstuk 2** wordt beschreven dat bij het langdurig kweken van MSCs van osteosarcoompatiënten, een dergelijke kwaadaardige ontaarding niet plaatsvond. Ondanks bijna twee jaar continue kweek, werd in geen van de MSC kweken de plotselinge toename van proliferatie gezien welke karakteristiek is voor *in vitro* maligne ontaarding. Wel ontstonden er, zowel in MSCs van gezonde donoren als in MSCs van osteosarcoompatiënten, gedurende het kweken binucleaire cellen. Bij genexpressieanalyse van lage passages MSCs bleek bij MSCs afkomstig van osteosarcoompatiënten een lagere expressie van "hematopoietic cell specific Lyn substrate 1" (*HCLST1*) dan MSCs afkomstig van gezonde donoren. Het eiwit afkomstig van *HCLST1* staat bekend om zijn rol bij B-cel receptor signalering en myelopoïese. Of verminderde expressie van dit gen in MSCs een rol speelt bij de ontwikkeling tot osteosarcoom is nog onbekend.

Behalve de differentiële expressie van *HCLST1* waren de MSCs van osteosarcoompatiënten en gezonde donoren zeer overeenkomstig. Er zijn verschillende mogelijke oorzaken voor het feit dat er zo weinig verschillen tussen MSCs van osteosarcoompatiënten en gezonde donoren waren. Het zou zo kunnen zijn dat de hypothese dat het osteosarcoom uit MSCs ontstaat, niet juist is. Daarnaast zou het kunnen zijn dat op de plek waar de MSCs voor deze studie geoogst zijn (de bovenrand van het heupbeen) de cellen niet bovenmatig gevoelig voor maligne ontaarding zijn, terwijl voorlopercellen op andere plaatsen (*in casu* aan het uiteinde van de lange pijpbeenderen waar de tumoren zich bevinden) dit wel zijn. Deze lokatiespecifieke gevoeligheid voor tumorontwikkeling kan aan intrinsieke verschillen in de voorlopercellen liggen (bijvoorbeeld

bij somatisch mozaïcisme), of aan specifieke omgevingsfactoren in de buurt van de groeischijf (endocriene en paracriene signalering). Een andere mogelijke verklaring voor het uitblijven van oncogene transformatie tijdens langdurig kweken, is dat dit onvoldoende is om kwaadaardige ontaarding plaats te laten vinden. Er wordt algemeen aangenomen dat er meerdere 'hits' nodig zijn om een gezonde cel tot een tumorcel te laten verworden. Mogelijk dat lokaal aanwezige groeifactoren of additionele genetische of functionele veranderingen zoals verlies van celcyclus controle noodzakelijk zijn voordat transformatie optreedt. Ook indien de tumorontwikkeling niet volgens een stapsgewijze opeenstapeling van genetische fouten ontstaat, maar er een catastrofale chromosomale gebeurtenis genaamd 'chromotripsis' optreedt, moet deze waarschijnlijk in een voor kwaadaardige ontaarding gevoelige genetische of omgevingsachtergrond plaatsvinden.

In **hoofdstuk 3** wordt beschreven welke factoren van prognostisch belang zijn voor de overleving van osteosarcoompatiënten met longmetastasen. Hieruit bleek, dat het aantal (histologisch vitale) longmetastasen en het mannelijke geslacht geassocieerd waren met een hogere kans op overlijden. In **hoofdstuk 4** werd middels een genoombrede genexpressie analyse in een relatief groot cohort van osteosarcoompatiënten aangetoond dat indien er een hoge expressie van macrofaag-geassocieerde genen in tumorbiopten aanwezig was, dit geassocieerd was met een lager risico voor gemetastaseerde ziekte. De resultaten beschreven in deze hoofdstukken impliceren dat patiënten met morfologisch vitale en/of een groot aantal metastasen baat zouden kunnen hebben bij immunotherapeutische strategieën die migratie naar en activatie van monocytten en macrofagen in osteosarcoom stimuleren.

De tumorgroei-bevorderende rol van tumor geassocieerde macrofagen in carcinomen is welbekend. Epitheliale tumoren met grote aantallen infiltrerende macrofagen hebben een slechtere prognose dan tumoren met weinig infiltrerende cellen, wat gerelateerd is aan de belangrijke rol die macrofagen spelen in de initiatie van angiogenese van deze tumoren. Macrofagen zijn zeer plastische cellen die, afhankelijk van hun omgeving en de activerende signalen die ze ontvangen, een tumor bevorderende of tumor inhiberende rol aan kunnen nemen. Cytokines zoals interferon (IFN)- $\gamma$  en bacteriële cel(wand)producten zoals muramyl-tri-peptide (MTP) kunnen macrofagen 'klassiek' activeren. Deze 'klassiek geactiveerde' M1-macrofagen brengen pro-inflammatoire cytokines zoals interleukine (IL)-1, IL-6 en IL-12 tot expressie en kunnen tumorcellen direct doden door fagocytose, zuurstofradicalen en cytokine-geïnduceerde cytotoxiciteit. Daarnaast kunnen zij NK en T cellen rekruteren en activeren en zo ook indirect voor tumorcel dood zorgen. Door IL-4 en IL-13 'alternatief geactiveerde' M2 macrofagen zijn belangrijk in weefselhomeostase en bevorderen wondgenezing en angiogenese. Het zijn deze M2 karakteristieken die vaak in verband gebracht worden met de 'pro-tumor' kwaliteiten van tumor geassocieerde macrofagen.

Zoals beschreven in **hoofdstuk 4**, waren een aantal genen die hoog tot expressie kwamen in biopten afkomstig van patiënten zonder metastasen, specifieke macrofaagmarkers zoals *CD14* en *MSR1*. Daarnaast bleek een groot aantal van de genen die hoog tot expressie kwamen in deze prognostisch gunstigere groep geassocieerd met macrofaagfuncties zoals antigeen verwerking en presentatie. Middels aanvullende immunohistochemische en genexpressie studies werd aangetoond dat de macrofaag geassocieerde genen inderdaad door macrofagen en niet door

tumorcellen tot expressie gebracht werden. In aanvullende cohorten werd bevestigd dat een hogere infiltratie met macrofagen geassocieerd was met een betere overleving.

William B. Coley was een chirurg die bottumoren behandelde. In 1891 voerde hij de eerste succesvolle immunotherapeutische behandelingen uit door bij patiënten met inoperabele tumoren een mengsel van bacteriële toxines in de tumor te spuiten. De grootste successen met deze zogeheten 'Coley's toxines' werden bij patiënten met tumoren van mesodermale origine, zoals osteosarcoom, geboekt. Ook meer recent zijn er aanwijzingen dat de klassieke activatie van macrofagen middels bacteriële celproducten tot een betere overleving van osteosarcoompatiënten leidt. Osteosarcoompatiënten met een postoperatieve wondinfectie hebben op de langere termijn een betere overleving, hetgeen bij muizenstudies afhankelijk van NK cellen en monocyt/macrofagen was. Een klinische trial waarbij liposomaal MTP (ook bekend onder de naam mifamurtide) werd toegevoegd aan de standaard adjuvante chemotherapeutische behandeling van osteosarcoompatiënten resulteerde in een significante verbetering in de zesjaarsoverleving van 70% naar 78%.

Het mechanisme waarmee macrofagen de metastasering in osteosarcoom direct of indirect inhiberen is nog niet opgehelderd. Zowel macrofagen met een M1 fenotype (met een hoge expressie van HLA-DR $\alpha$ ) als macrofagen met een M2 fenotype (met een hoge expressie van CD163) waren aanwezig in osteosarcomen. Het aantal macrofagen in de tumor was positief gecorreleerd met zowel een betere histologische respons op chemotherapie, als met een groter aantal vaten in de tumor, een maat voor angiogenese. Mogelijk is de influx van macrofagen in osteosarcoom een 'Trojaans paard', waarbij ze als M2-type macrofagen de tumor ondersteunen door expressie van matrix metalloproteinasen (MMPs) en het beïnvloeden van de angiogenese. Ten gevolge van endogene (door immunogene celdood) of exogene (door de toediening van bijvoorbeeld MTP) 'danger' signalen kan vervolgens een verandering van fenotype richting een anti-tumor M1 macrofaag plaatsvinden en wordt de aanvankelijke vriend, de vijand van de tumorcellen (Fig. 7.2).

In toekomstige studies dient het effect van osteosarcoomcellen op de differentiatie en polarisatie van monocyt/macrofagen en *vice versa* onderzocht te worden, zowel middels *in vitro* modellen als in *in vivo* xenograft modellen. Toekomstige klinische trials moeten zijn ontworpen om niet alleen de effectiviteit van macrofaag activerende agentia zoals mifamurtide te onderzoeken, maar ook de onderliggende mechanismen te bestuderen. Het onderzoeken van biologisch materiaal (perifere bloedcellen, serum en tumormateriaal) voorafgaand, gedurende en na de klinische trial is daarbij essentieel. Alleen dan kan antwoord worden gegeven op een aantal essentiële vragen. Ten eerste, maakt het aantal macrofagen dat bij aanvang van de behandeling aanwezig is in de tumor uit voor de effectiviteit van therapeutische macrofaagactivatie? Ten tweede, wat is de rol van chemotherapie en immunogene celdood van OS in de activatie van macrofagen? Ten derde, is er een rol voor de secundaire activatie van het adaptieve immuunsysteem in de effectiviteit van deze op het aangeboren immuunsysteem gerichte therapieën?

Natural killer (NK) cellen herkennen en doden virusgeïnfecteerde en getransformeerde cellen wanneer de balans tussen signalen afkomstig van activerende en inhiberende receptoren naar activatie overslaat (Fig. 1.6). Osteosarcoomcellen bleken in hoge mate gevoelig voor lysis door NK cellen (**hoofdstuk 5 en 6**), wat nog verder verbeterd kon worden door de NK cellen met cytokines

zoals IL-15 en IFN- $\alpha$  te activeren. Belangrijk was, dat ook chemotherapie-resistente cellen gevoelig waren voor lysis door NK cellen. NK cellen van osteosarcoompatiënten hadden een fenotype en een lytische capaciteit die vergelijkbaar was met NK cellen van gezonde donoren. Ook in een autologe setting was er enige cytolytische activiteit van NK cellen tegen de eigen osteosarcoomcellen, met een goede verbetering van de cytolytische activiteit na voorbehandeling met IL-15 of IFN- $\alpha$ . Deze resultaten impliceren dat zowel autologe als allogene geactiveerde NK cellen (hetzij *in vivo* dan wel *ex vivo*) een mogelijke effectieve therapie zou kunnen zijn voor osteosarcoompatiënten. Er is echter een theoretisch voordeel van het gebruiken van allogene NK cellen. NK cellen worden in hun cytolytische activiteit geïnhibeerd wanneer 'killer cell immunoglobulin-like' receptoren (KIRs) aan de bijbehorende 'major histocompatibility complex' (MHC) klasse 1 liganden binden. In een allogene setting, kan er sprake zijn van een 'mismatch' tussen de KIRs en de MHC klasse 1 liganden, wat resulteert in een vermindering van de inhiberende signalering en theoretisch een grotere effectiviteit van NK cel gebaseerde immunotherapie. Gezien de relatief hoge expressie van MHC klasse 1 op osteosarcoomcellen, zou dit een belangrijke overweging kunnen zijn in het ontwerpen van toekomstige klinische trials.

Een nog onbeantwoorde vraag is, of er *in vivo* voldoende migratie van NK cellen optreedt naar de tumorcellen om tot klinisch relevante tumorcellulysis te leiden. Mogelijk dat xenograft modellen met het in beeld brengen van geïnfundeerde, gelabelde effector cellen hier een antwoord op kan geven. Ook kan in preklinische diermodellen onderzocht worden wat de toegevoegde rol zou kunnen zijn voor 'antibody dependent cellular toxicity' (ADCC). Bij ADCC herkent een (gehumaniseerd) antilichaam de tumorcel en bindt vervolgens via het Fc-domein aan speciale antilichaamreceptoren (Fc-receptoren) op monocyten of NK cellen. Dit concept is bestudeerd in *in vitro* studies waarbij bleek dat middels behandeling met het anti-EGFR antilichaam cetuximab op deze wijze een toename van de activiteit van NK cellen richting osteosarcoomcellen kon worden bereikt.

De veiligheid en effectiviteit van NK cel gebaseerde immunotherapeutische strategieën dient in fase I/II klinische trials verder onderzocht te worden. Een mogelijke strategie is de infusie van cytokine-geactiveerde donor NK cellen in een allogene (met name haplo-identieke) stamceltransplantatie-setting. Op deze wijze kan maximaal gebruik worden gemaakt van de KIR-ligand mismatch tussen donor en ontvanger en zal er hopelijk maximale anti-tumor effectiviteit worden behaald.

Nieuwe behandelingen voor patiënten met hooggradig osteosarcoom zijn hard nodig, zeker indien er sprake is van gemetastaseerd ziekte. De afgelopen twintig jaar is er nauwelijks verbetering in de overleving van deze vaak jonge patiëntengroep bereikt, ondanks hoge dosis chemotherapie en agressieve chirurgie. Het toepassen van immunotherapie is een veelbelovende strategie, met name in een multimodale setting gecombineerd met chemotherapie. Hierbij kan optimaal gebruik kan worden gemaakt van de immunogene celdood die door specifieke chemotherapie kan worden geïnduceerd, waarna (geactiveerde) immuuncellen verdere immunosurveillance en antitumor cytotoxiciteit kunnen zorgen. Vanwege de zeldzaamheid van deze tumor en de benodigde expertise in zowel behandeling als biological monitoring, dienen nieuwe therapieën vanuit expertise centra en idealiter in internationaal samenwerkingsverband te worden onderzocht.





