



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Immune cell complexity in the tumor microenvironment of breast cancer
Salvagno, C.

Citation

Salvagno, C. (2019, October 22). *Immune cell complexity in the tumor microenvironment of breast cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/79824>

Version: 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/1887/79824>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/79824> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Salvagno, C.

Title: Immune cell complexity in the tumor microenvironment of breast cancer

Issue Date: 2019-10-22

Nederlandse Samenvatting

De bevinding dat niet-getransformeerde cellen tumoren infiltreren en bijdragen aan de biologie van kanker, heeft geleid tot veel aandacht voor onderzoek naar de interactie tussen kanker- en niet-kanker cellen¹. Het micro-milieu van tumoren (TME) bestaat uit verschillende cel populaties zoals endotheel cellen, fibroblasten en immuuncellen, welke een belangrijke rol spelen in tumor- ontwikkeling en progressie, maar ook bij de therapeutische respons op anti-kanker therapieën. Opvallend is dat juist immuuncellen een paradoxale rol hebben in tumoren. Terwijl sommige immuuncellen (zoals CD8⁺ T lymfocyten en NK cellen), kankercellen kunnen herkennen en doden, kunnen andere immuuncellen (zoals macrofagen en neutrofielen), tumor- ontwikkeling, groei en uitzaaiing bevorderen.

Macrofagen maken een belangrijk deel uit van de TME van tumoren, en zijn onderwerp geweest van tal van studies gericht op het begrijpen van hun rol in tumorprogressie en therapie respons². Van oudsher werden tumor-geassocieerde macrofagen (TAMs) beschreven als antitumoraal (M1) of pro-tumoraal (M2) en onderscheiden op basis van de expressie van enkele markers. Echter, het is nu duidelijk dat het fenotype en de functie van TAMs veel complexer is dan deze binaire definitie doet lijken^{3,4}. Macrofagen zijn plastische myeloïde cellen, die continu hun fenotype aanpassen op basis van signalen die ze uit hun micro-milieu ontvangen. Omdat verschillende tumoren ook verschillen in hun bijhorende micro-milieu, is het idee ontstaan dat een enkele definitie van een TAM niet bestaat, en dat TAMs uit verschillende tumoren dus ook niet per definitie dezelfde functie en fenotype hebben. Een directe vergelijking van het transcriptoom van TAMs geïsoleerd uit verschillende subtypes borstkanker is echter nog niet uitgevoerd. Een van de hypothesen in dit proefschrift is daarom ook dat onderzoek naar de transcriptionele profielen van TAMs uit verschillende borstkanker subtypes relevant kan zijn, en kan bijdragen aan het stellen van een betere prognose.

In verschillende pre-klinische modellen is aangetoond dat macrofagen tumor-ondersteunende functies hebben⁵. Daarnaast zijn macrofagen geassocieerd met een slechte prognose in verscheidene humane kankers. Om deze redenen worden immuno-modulatoire medicijnen, gericht op het depletieren van macrofagen, momenteel geëvalueerd in klinische trials⁶. Een manier om TAMs te depletieren is door te interfereren met de Colony Stimulating Factor-1 (CSF1)/CSF1 receptor (CSF-1R) signalerings route, welke van vitaal belang is voor macrofagen. Dit is bijvoorbeeld mogelijk met het gebruik van agonistische antilichamen tegen CSF-1R⁷. Om het succes van op macrofaag gerichte medicijnen te maximaliseren, is het uitermate belangrijk om de effecten van deze medicijnen op macrofagen en de kanker te begrijpen, maar ook om optimale medicijncombinaties te vinden, gebruikmakend van conventionele therapieën. Als zodanig, is een deel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift erop gericht om uit te zoeken hoe de effectiviteit van anti-CSF-1R door combinaties met chemotherapieën gemaximaliseerd kan worden. Ook worden de achterliggende mechanismes aangehaald.

Naast macrofagen, zijn neutrofielen ook belangrijk voor kankerprogressie en de formatie van metastases⁸. Neutrofiel niveaus zijn vaak verhoogd in kankerpatiënten

en een hoge neutrofiel-tot-lymfocyt ratio in circulatie is voorspellend voor een slechtere overleving in verschillende kankertypes^{9,10}. Bovendien correleert chemotherapie-geïnduceerde neutropenie in borstkanker patiënten met een betere prognose^{11,12}. Daarom is een beter begrip van de rol van neutrofielen op de chemotherapie respons nodig om de anti-kanker effectiviteit van deze medicijnen te verbeteren. Om dat te kunnen doen, beschrijven we in deze thesis een nieuw muismodel voor de conditionele depletie van neutrofielen.

Het algemene doel van het werk in dit proefschrift is om nieuwe inzichten te vergaren in de complexiteit van immuuncellen, met een focus op macrofagen en neutrofielen, in de context van borstkanker. Hoe tumoren het fenotype van TAMs kunnen beïnvloeden, en hoe immuuncellen de respons op chemotherapie beïnvloeden, zijn de hoofdvragen van deze thesis.

Om intratumorale immuuncellen te bestuderen beschrijven we in **hoofdstuk 2** een methode om immuuncelpopulaties te verkrijgen uit vers geïsoleerd weefsel. Deze methode is gebaseerd op antilichaam-gemedieerde verrijking van immuuncellen met magnetische cel sortering, gevolgd door purificatie van de geselecteerde populatie met multi-color flow cytometry-based sorting.

We gebruiken deze aanpak in **hoofdstuk 3**, waar we TAMs isoleren van twee verschillende genetisch gemanipuleerde muismodellen voor borsttumor ontwikkeling, namelijk, de *K14cre;Cdh1^{F/F};Trp53^{F/F}* en *MMTV-NeuT* modellen^{13,14}. Deze modellen lijken respectievelijk op humaan invasief lobulair carcinoma (ILC) en HER2⁺ borst tumoren. Bio-informatische analyse van TAM populaties uit deze modellen identificeert een overlappende gen-signatuur, erop duidend dat TAMs uit verschillende modellen ook een overlappend fenotype en functie kunnen hebben. Echter, uit **hoofdstuk 3** blijkt dat er borstkanker subtype specifieke gen-signaturen bestaan, toch indicierend dat verschillende TMEs ook op verschillende manieren het transcriptionele profiel van TAMs dicteren. Interessant genoeg, een selectie van genen specifiek voor het *K14cre;Cdh1^{F/F};Trp53^{F/F}* model, correleerde met een slechte overleving van ILC patiënten in twee cohorten.

Chemotherapie is nog steeds de meest gebruikelijke behandeling voor de meeste kankertypes. Chemotherapeutische medicijnen doden kankercellen niet alleen, maar beïnvloeden ook het aantal en fenotype van immuuncellen. Begrip over hoe verschillende chemotherapieën het immuunsysteem beïnvloeden, kan het maken van rationele keuzes voor combinatietherapieën faciliteren. In **hoofdstuk 4** volgt een review over de effecten van chemotherapie op immuuncellen, en stellen we voor dat chemotherapieën die immunosuppressie verlichten, gecombineerd kunnen worden met immuno-therapeutische medicijnen, om het effect van deze te versterken. Naast het feit dat chemotherapieën immuuncellen beïnvloeden, hebben immuuncellen zelf ook een invloed op de therapeutische effectiviteit van deze medicijnen. Het is in het bijzonder bekend dat macrofagen het anti-tumor effect van verschillende chemotherapieën kan tegenwerken. Door een macrofaag depleterend medicijn te gebruiken, anti-CSF-1R, in het *K14cre;Cdh1^{F/F};Trp53^{F/F}* model voor spontane borstkanker, laten we in **hoofdstuk 5** van deze thesis zien dat CSF-1R inhibitie de effectiviteit van chemotherapie versterkt, afhankelijk van het type

chemotherapie. We beschrijven dat anti-CSF-1R synergistisch werkt met platinumhoudende medicijnen, zoals cisplatin. We hebben geen synergie gevonden met bijvoorbeeld docetaxel, wat het belang aangeeft om de juiste medicijnen met elkaar te combineren. Daarnaast hebben we ontdekt dat CSF-1R inhibitie type 1 interferon signalering stimuleert in de tumor, wat essentieel is voor het geobserveerde anti-kanker effect van de combinatie cisplatin met anti-CSF-1R. Ook demonstreren we dat verdere depletie van immunosuppressieve neutrofielen van essentieel belang is om een succesvolle anti-tumor respons op gang te brengen in een immunogeen zwak model.

Tot zover zijn de meest gebruikelijke methodes om neutrofielen te bestuderen het depletieren van de populatie, of hun rekrutering te blokkeren. Huidige strategieën hiervoor zijn echter niet specifiek voor neutrofielen, of slechts voor een korte termijn. Daarom is er een duidelijke behoefte aan genetische modellen voor lange termijn neutrofiel depletie, op een conditionele en reversibele manier. In **hoofdstuk 6** beschrijven we de ontwikkeling en karakterisatie van het hMRP8-ATTAC (human migration inhibitory factor-related protein 8-Apoptosis Through Targeted Activation of Caspase 8) model¹⁵. Dit is een nieuw gegenereerd genetisch muismodel, voor de conditionele en reversibele depletie van neutrofielen. Wanneer een chemische dimerizer wordt geïnjecteerd, wordt het transgen dat het caspase-8-FKBP fusie-eiwit draagt geactiveerd, met apoptose voornamelijk in neutrofielen tot gevolg. Alhoewel deze methode neutrofielen reduceert onder homeostatische condities, gebeurt dit niet in tumor-dragende dieren. Dit geeft aan dat verbeteringen aan het model nodig zijn om een efficiënte neutrofiel depletie te behouden, in de context van chronische inflammatie.

Hoofdstuk 7 bevat een generieke discussie waarin ik de bevindingen uit dit proefschrift in de context van de huidige literatuur plaats, en vervolgens mijn standpunten beschrijf over de toekomst van mijn onderzoek.

References

1. Maman, S. & Witz, I.P. A history of exploring cancer in context. *Nat Rev Cancer* **18**, 359-376 (2018).
2. Cassetta, L. & Pollard, J.W. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nat Rev Drug Discov* (2018).
3. DeNardo, D.G. & Ruffell, B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* (2019).
4. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* **23**, 549-555 (2002).
5. Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L. & Allavena, P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* **14**, 399-416 (2017).
6. Cannarile, M.A., *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. *J Immunother Cancer* **5**, 53 (2017).
7. Ries, C.H., *et al.* Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. *Cancer Cell* **25**, 846-859 (2014).
8. Coffelt, S.B., Wellenstein, M.D. & de Visser, K.E. Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nat Rev Cancer* **16**, 431-446 (2016).
9. Templeton, A.J., *et al.* Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* **106**, dju124 (2014).
10. Wei, B., *et al.* The neutrophil lymphocyte ratio is associated with breast cancer prognosis: an updated systematic review and meta-analysis. *Onco Targets Ther* **9**, 5567-5575 (2016).
11. Han, Y., *et al.* Prognostic value of chemotherapy-induced neutropenia in early-stage breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **131**, 483-490 (2012).
12. Ma, R.M., *et al.* Prognostic Value of Chemotherapy-Induced Neutropenia at the First Cycle in Invasive Breast Cancer. *Medicine (Baltimore)* **95**, e3240 (2016).
13. Boggio, K., *et al.* Interleukin 12-mediated prevention of spontaneous mammary adenocarcinomas in two lines of Her-2/neu transgenic mice. *J Exp Med* **188**, 589-596 (1998).
14. Derksen, P.W., *et al.* Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer Cell* **10**, 437-449 (2006).
15. Pajvani, U.B., *et al.* Fat apoptosis through targeted activation of caspase 8: a new mouse model of inducible and reversible lipodystrophy. *Nat Med* **11**, 797-803 (2005).