



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

Difficulties and dangers of CEA-targeted immunotherapy against colorectal cancer

Bos, Rinke

Citation

Bos, R. (2006, October 18). *Difficulties and dangers of CEA-targeted immunotherapy against colorectal cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4919>

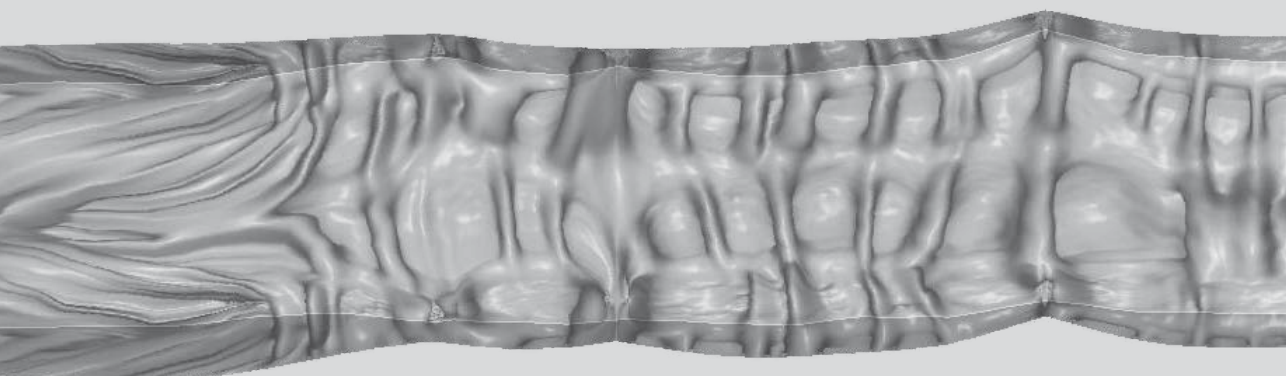
Version: Corrected Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4919>

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

6



Nederlandse samenvatting

Colon kanker

Colon (dikke darm) kanker is één van de meest voorkomende kankers en is de tweede doodsoorzaak door kanker in geïndustrialiseerde landen. Het voorstadium van colon kanker begint meestal als een laesie van het colon of rectum epitheel wat een poliep genoemd wordt. Poliepen kunnen goedaardig zijn, maar ze kunnen zich ook over een aantal jaren ontwikkelen tot ernstigere afwijkingen die uiteindelijk tot kanker kunnen leiden. Het stadium van een tumor wordt bepaald door middel van het TNM stadia systeem (zie Box I in de inleiding). Dit systeem kijkt naar de mate van invasie van de primaire tumor, de aan- of afwezigheid van tumorcellen in regionale lymfeklieren en de status van de uitzaaiing van tumorcellen naar andere delen van het lichaam (metastasering). Als de tumor vroeg ontdekt wordt en zich nog niet heeft verspreid over het lichaam (stadium I) is de geschatte 5 jaars overleving van de patiënt 90%. Helaas worden maar 39% van de colon tumoren in dit stadium gediagnosticeerd. De overleving voor patiënten met gemetastaseerde tumoren varieert van een paar maanden tot meer dan 30 maanden met de huidige behandelingen. De meest voorkomende locatie van metastasen in patiënten met colon kanker is de lever en deze metastasen zorgen voor tenminste 2/3 van de overlijdensgevallen van deze patiënten. Colon kanker kan genezen worden als de poliepen in een vroeg stadium gevonden en verwijderd worden. In het geval van een verder gevorderd stadium wordt chemotherapie of chemotherapie plus bestraling gegeven voor en/of na de resectie van de primaire tumor. Door de introductie van nieuwe chemotherapeutische middelen de afgelopen jaren is de prognose enorm

verbeterd. Hoewel de huidige behandelingsmethoden tot betere resultaten leiden hebben de patiënten nog steeds een zwakke prognose met een totale overleving van 20 maanden. Daarom is het van groot belang dat andere behandelingsmogelijkheden die gericht zijn tegen colon kanker worden bestudeerd. Het immuunsysteem is een complex netwerk bestaande uit verschillende cellen die nauw met elkaar samenwerken en in staat zijn virussen, bacteriën, maar ook kwaadaardige tumor cellen te herkennen en op te ruimen en kan daarom een belangrijke rol spelen bij de behandeling van kanker.

Het immuunsysteem

Het immuunsysteem kan worden onderverdeeld in een aspecifiek en een adaptief of 'specifiek' deel. Het aspecifieke deel is direct werkzaam en zorgt voor de eerste afweer, maar is minder specifiek voor de ziekteverwekker. Het adaptieve deel past zich aan de ziekteverwekker aan, dit kost tijd, maar zal uiteindelijk een sterke afweer worden. Bovendien is het lichaam daarna vaak langdurig beschermd tegen deze ziekteverwekker door de vorming van een immunologisch geheugen en hierdoor zal de immunrespons sterker zijn als een zelfde ziekteverwekker voor de tweede keer herkend wordt. Voor het induceren van een immunrespons tegen tumor cellen speelt de adaptieve afweer een belangrijke rol. B en T cellen, ofwel lymfocyten, zijn van groot belang binnen deze tak van afweer en zijn in staat specifieke structuren te herkennen via hun B- of T-cel receptor. Na activatie produceren B cellen antistoffen die zullen binden aan een bepaald antigeen op een cel of aan de ziekteverwekker zelf waardoor andere componenten van het immuunsysteem dit complex herkennen en kunnen verwijderen.

De stamcellen voor alle bloedcellen bevinden zich in het beenmerg. De uitrijping van T lymfocyten vindt echter plaats in de thymus (zwezerik), maar dit proces is grotendeels voltooid voor de puberteit. Tijdens het verblijf in de thymus worden de nog onrijpe T lymfocyten als het ware opgeleid in het maken van verschil tussen lichaamseigen en lichaamsvreemd. De meerderheid van de T lymfocyten in opleiding zakt voor het examen en wordt vernietigd. Een minderheid mag de thymus verlaten en gaat functies vervullen als afweercel in het lichaam. T lymfocyten binden niet aan vrij antigeen, maar herkennen vreemde eiwitten alleen als klein fragment (peptide) in de context van MHC moleculen op het oppervlak van antigeen presenterende cellen (APCs). Deze interactie leidt tot activatie van de T lymfocyt waardoor deze zich zal gaan vermenigvuldigen. T lymfocyten kunnen worden onderverdeeld in 3 hoofdgroepen: CD4+ helper T cellen (Th cellen), CD4+ suppressor T cellen (Treg cellen) en CD8+ cytotoxische T cellen (CTLs). Th cellen helpen bij de activatie van B cellen waardoor ze gaan delen en differentiëren tot antistof producerende cel en daarnaast wordt door de Th cellen de activatie van CTLs geoptimaliseerd door direct contact met de APC en de productie van cytokinen (boodschapperstoffen van het immuunsysteem) die een stimulerende werking hebben. CTLs worden specifiek tegen een bepaald antigeen geactiveerd en zijn dan in staat om cellen te doden die datzelfde antigeen tot expressie brengen. De derde hoofdgroep cellen zijn de Treg cellen die juist cytokinen produceren die de immunrespons onderdrukken om het immuunsysteem onder controle te houden.

Immunotherapie

Bij het ontwikkelen van immunotherapie tegen kanker is het van groot belang de immuunrespons te richten op een antigeen dat alleen op de tumor cellen zit, zodat ook alleen het tumor weefsel wordt aangevallen. Dit is alleen het geval bij tumoren die door een virus ontstaan (baarmoederhalskanker door Humaan Pappiloma Virus, leukemie door HTLV-1, lever tumoren door hepatitis-B and C virussen) waarbij het immuunsysteem een peptide van het lichaamsvreemde virus kan herkennen op de tumorcel. In andere gevallen waar een tumor ontstaat door een spontane mutatie kunnen immuunresponsen worden opgewekt tegen antigenen die ook op gezonde cellen aanwezig zijn, maar verhoogd tot expressie komen op bepaalde tumor cellen. Een van de eerst beschreven antigenen dat gebruikt is als 'target' voor immunotherapie is Carcino Embryonaal Antigeen (CEA). CEA expressie op normaal weefsel in volwassen mensen is detecteerbaar in colon, maag, tong, slokdarm, baarmoederhals, zweetklieren en prostaat. Maar de expressie is sterk verhoogd op verschillende tumoren van epitheliale oorsprong, voornamelijk colon kanker. Ondanks deze verhoogde expressie op de tumor blijft het risico bestaan dat ook gezond weefsel wordt aangevallen door het immuunsysteem (auto-immuniteit) en dit zou kunnen leiden tot ernstige schade aan de desbetreffende weefsels. Er zijn al meerdere klinische trials uitgevoerd met immunotherapie gericht tegen CEA van patiënten met colon kanker, maar geen van deze therapieën had een positief effect op de tumor (en er was ook geen auto-immuniteit). Doordat CEA ook op gezond weefsel voorkomt en ook in het serum van gezonde mensen te vinden is, kan het immuunsysteem tolerant worden zodat er geen goede immuunrespons opgewekt kan worden. Om te kijken of dit het geval is en of dit kan verklaren waarom er geen effect is van immunotherapie in patiënten, heb ik dit nauwkeurig uitgezocht in een muismodel.

Dit proefschrift

Om de resultaten uit de muizen studies goed te kunnen vergelijken met de humane setting is gebruik gemaakt van CEA-tg muizen. Deze muizen hebben humaan CEA en dit komt tot expressie op dezelfde weefsels als in mensen. Naast deze muizen zijn wild-type muizen gebruikt die geen CEA expressie hebben waardoor het immuunsysteem CEA herkent als lichaamsvreemd antigeen waartegen een goede immuunrespons geïnduceerd kan worden. Met behulp van deze twee modellen konden de immuunresponsen na vaccinatie getest en vergeleken worden. Uit de experimenten is gebleken dat door de CEA-expressie in de CEA-tg muis inderdaad tolerantie is ontstaan voor CEA en dat CEA specifieke vaccinatie niet leidt tot een goede immuunrespons in deze muizen. De expressie van CEA in een specifieke groep cellen in de thymus (epitheliale cellen in de medulla van de thymus, mTEC) blijkt een belangrijke rol te spelen bij de inductie van deze 'centrale' tolerantie. Data in dit proefschrift laten ook zien dat CEA tot expressie komt in deze zelfde cellen in de thymus van mensen. Dit suggereert dat ook het immuunsysteem in mensen tolerant is voor CEA en deze bevindingen zouden ook kunnen verklaren waarom immunotherapie in patiënten dusver geen effect heeft gehad op tumoren en dat er geen auto-immuniteit is waargenomen.

Wat gebeurt er als er wel een sterke CEA specifieke respons wordt geïnduceerd in CEA-tg muizen? Zal dat een effect op de tumor hebben en/of zal dat ook leiden tot auto-immuniteit? Om deze vragen te kunnen beantwoorden hebben we lymfocyten uit een CEA gevaccineerde wild-type muis ingespoten bij een CEA-tg muis die een dag later CEA positieve tumorcellen subcutaan krijgt ingespoten. Deze CEA specifieke lymfocyten zijn in staat de CEA positieve tumor op te ruimen in de wild-type muis, maar bleken in de CEA-tg muis geen enkel effect op de tumorgroei te hebben. Hieruit blijkt dat naast de centrale tolerantie in de thymus, ook in de periferie van de CEA-tg muis regulerende mechanismen actief zijn die de CEA specifieke lymfocyten onderdrukken. Suppressie van immuun regulatie door sublethale lichaamsbestraling van de CEA-tg muis een dag voor het inspuiten van de CEA specifieke lymfocyten resulteerde in een vertraagde tumor groei, maar nog niet tot complete opruiming van de tumor. Om dit te bereiken was naast bestraling ook blokkade van receptoren voor het immuun onderdrukkende cytokine interleukine-10 (IL-10) of depletie van CD25 positieve cellen (Treg cellen) nodig. Door de sublethale bestraling te vervangen door lethale bestraling in combinatie met beenmergtransplantatie werd hetzelfde effect op de tumor waargenomen en de meerderheid van de muizen bleven tumor vrij. Belangrijke observatie hierbij was dat de CEA-tg muizen die behandeld waren met IL-10 receptor blokkerende antistoffen en de muizen die lethaal bestraald waren symptomen vertoonden van colitis (ontsteking in het colon). De behandelde CEA-tg muizen vertoonden ernstig gewichtsverlies, een verkorte colon, ernstige schade aan het darmepitheel en een hoge infiltratie van CEA specifieke cellen in de darm. Deze symptomen waren niet detecteerbaar bij de wild-type controle muizen die dezelfde behandeling ontvingen, wat aangeeft dat de inductie van auto-immuniteit CEA specifiek is. Th cellen en CTLs bleken beide nodig voor het effect op de tumor, maar alleen de Th cellen waren verantwoordelijk voor de inductie van colitis. De behandelingsmethode waarbij naast sublethale bestraling en injectie van CEA specifieke lymfocyten ook de Treg cellen in de CEA-tg muis gedepleteerd werden was zeer effectief in het opruimen van de tumor en veroorzaakte ook geen auto-immuun responsen. Deze behandeling hebben we daarom ook getest in een spontaan tumor model (APC^{1638N} muizen) waarbij de muizen door een mutatie in het Apc tumor suppressor gen, in ongeveer 9 maanden spontaan tumoren ontwikkelen in de darm. Om het effect van CEA expressie te bestuderen is ook in dit experiment gebruik gemaakt van wild-type muizen (APC^{1638N}) en CEA-tg muizen (APC^{1638N} × CEA-tg), wat betekent dat de APC^{1638N} × CEA-tg muizen ook CEA op normale weefsels tot expressie brengen, maar dat de expressie op de tumor cellen hoger is. De behandeling werd gestart op een leeftijd van 8 maanden en 2 maanden later vond de analyse van de tumoren in de darm plaats. Het aantal tumoren en ook de gemiddelde grootte van de tumoren was significant lager in de APC^{1638N} × CEA-tg muizen vergeleken met de APC^{1638N} muizen. Dit betekent dat de behandeling een sterke CEA specifieke immuunrespons heeft geïnduceerd die in staat is CEA-positieve tumor cellen op te ruimen. Heel interessant is ook dat er geen symptomen van colitis zijn waargenomen en dat dus ondanks een effectieve anti-tumor respons er geen sprake was van een auto-immuun respons.

Tenslotte

De experimenten en daaruit volgende bevindingen beschreven in dit proefschrift geven een goed overzicht van de mogelijkheden, maar ook de moeilijkheden en gevaren van immunotherapie gericht tegen een auto antigeen als CEA. De inductie van een sterke CEA specifieke immuunrespons door remming of deletie van regulerende mechanismen leidt ook tot een verhoogd risico op de inductie van auto-immuun reacties die ernstige schade kunnen aanrichten in belangrijke organen. Daarentegen is ook gebleken dat effectieve tumor immuniteit mogelijk is zonder de inductie van auto-immuun reactiviteit door de depletie van Treg cellen. Zoals hierboven beschreven zijn voornamelijk Th cellen verantwoordelijk voor de inductie van schade in de darm en om het risico hierop te verlagen zijn we nu aan testen of selectieve inductie van CEA specifieke CTL responsen wel het gewenste effect op de tumor zal hebben, maar niet zal leiden tot auto-immuniteit.

Al het onderzoek in acht nemend betreffende immunotherapie dat ongeveer 15 jaar geleden startte in muismodellen, kan nu geconcludeerd worden dat we een enorme vooruitgang hebben geboekt betreffende de kennis van interacties tussen het immuunsysteem en tumor cellen. Vooruitgang in klinische effecten van immunotherapie is voornamelijk geboekt voor virus geïnduceerde tumoren en melanomen, maar tot dusver, zijn er nog geen indrukwekkende klinische effecten beschreven voor patiënten met colon kanker. Om de klinische effecten te verbeteren en de behandelingsmogelijkheden te optimaliseren, moeten alle studies nauwkeurig de geïnduceerde immuunresponsen en de rol van deze respons in anti-tumor immuniteit bestuderen.