

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/18930> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Voskamp, Pieter

Title: Local effects of immunosuppressants in the skin and impact on UV carcinogenesis

Date: 2012-05-09

Chapter 7

Nederlandse samenvatting

Orgaantransplantatie en huidkanker

Sinds de jaren zestig zijn orgaantransplantaties tussen mensen steeds vaker succesvol. Een belangrijke rol daarin hebben medicijnen die het afweersysteem onderdrukken (immuunsuppressiva) en daarmee afstoting van het getransplanteerde orgaan voorkomen. Naarmate de levensduur van patiënten met een donororgaan toenam bleek ook het risico op kanker bij deze patiënten dramatisch toe te nemen. Vooral het risico op het plaveiselcelcarcinoom van de huid is sterk verhoogd in deze patiëntengroep vergeleken met de algemene populatie. Risico op huidkanker is duidelijk gerelateerd aan ultraviolet (UV) licht blootstelling. Dat geldt ook voor transplantatiepatiënten, waarbij de huidkankers met name op zonbeschenen lichaamsdelen ontstaan. In Europa en de VS hebben 40-61% van de orgaantransplantatiepatiënten huidkanker ontwikkeld binnen 20 jaar, in het zonnige Australië ligt dat percentage zelfs op 70-82%.

Immuunsuppressiva

De immuunsuppressiva waarmee transplantatiepatiënten behandeld worden, kunnen ingedeeld worden in drie categorieën: remmers van calcineurine (cyclosporine en tacrolimus), purine synthese (azathioprine en mycofenolaat mofetil (MMF)) of mTOR (rapamycine). Deze immuunsuppressiva remmen de activatie en deling van T-cellen. De immuunsuppressieve therapie voor orgaantransplantatiepatiënten was aanvankelijk gericht op een optimale onderdrukking van immuunreacties tegen het donororgaan, waarbij het toegenomen risico op kanker als min of meer onvermijdelijk werd geaccepteerd. Door onderzoek is echter ook bekend geworden dat een aantal van deze medicijnen niet uitsluitend op cellen van het immuunsysteem effect heeft. Cyclosporine remt herstel van beschadigd DNA en kan evenals azathioprine geprogrammeerde celdood verhinderen (belangrijke processen om het lichaam te beschermen tegen gemuteerde cellen). In tegenstelling hierop hebben de nieuwere immuunsuppressiva MMF en rapamycine juist een remmende werking op tumorontwikkeling. Dit geeft aan dat het risico op huidkanker bij personen met orgaantransplantaties mogelijk sterk verminderd kan worden door aanpassing van de immuunsuppressieve behandeling. Om ethische en praktische redenen kunnen de effecten van verschillende immuunsuppressiva op processen betrokken bij kankerontwikkeling niet experimenteel onderzocht worden bij patiënten. Bij de experimenten beschreven in dit proefschrift is daarom voornamelijk gebruik gemaakt van twee modellen: een huidmodel en een muismodel.

Doel van de studies

Het centrale doel van de studies beschreven in dit proefschrift was om experimentele gegevens te verkrijgen die bij kunnen dragen aan het verminderen van het huidkankerrisico dat wordt veroorzaakt door immuunsuppressieve therapie. Dit is verder toegespitst op het bepalen van effecten van immuunsuppressiva op de reactie van huidcellen op UV blootstelling en effecten op UV-geïnduceerde huidkankerontwikkeling. We hebben hiervoor effecten van immuunsuppressiva op verschillende stadia van huidkankerontwikkeling in kaart gebracht. Het op deze wijze vergelijken van effecten van immuunsuppressiva kan bijdragen aan de vermindering van het risico op huidkanker.

Humaan huidmodel

Het humane huidmodel dat is gebruikt bestaat uit een dermale collageenmatrix waarin fibroblasten zijn gezaaid met daarboven een epidermis bestaande uit keratinocyten. Dit huidmodel bestaat uit primaire humane cellen en is goed vergelijkbaar met de humane huid wat betreft morfologie en expressie van diverse karakteristieke eiwitten. Dit model is daarom geschikt om de reactie van keratinocyten op UV blootstelling te bepalen. De meeste huidmodellen kunnen slechts een beperkte tijd in kweek worden gehouden en zijn daarom niet geschikt voor het bepalen van lange termijn effecten van herhaalde UV blootstelling.

Haarloze muis

De haarloze muis (SKH1) is een veelgebruikt model bij studies naar huidkankerontwikkeling door UV. Deze muizen hebben een functionerend immuunsysteem en de huid lijkt in veel opzichten op die van de mens. Wanneer haarloze muizen herhaaldelijk blootgesteld worden aan UV ontwikkelen zich in de epidermis clusters van cellen die gemuteerd p53 tot expressie brengen (mutant-p53 celclusters). Deze mutant-p53 celclusters ontstaan als een clonale expansie van een gemuteerde keratinocyt en zijn al aanwezig voordat huidkankers zich ontwikkelen. De huidtumoren die ontstaan zijn voornamelijk plaveiselcelcarcinomen en goedaardige voorlopers daarvan (actinische keratosen). Aangezien de meeste plaveiselcelcarcinomen een gemuteerd p53 bevatten met vergelijkbare mutaties als in mutant-p53 celclusters, wordt het muteren van p53 als een vroege gebeurtenis beschouwd in tumorvorming en worden mutant-p53 celclusters als voorlopers van plaveiselcelcarcinomen gezien. Zoals eerder genoemd zijn plaveiselcelcarcinomen het type kanker waarvan de incidentie het meest verhoogd is in orgaantransplantatiepatiënten. Haarloze muizen lijken daarom geschikt om effecten van immuunsuppressiva op UV-geïnduceerde huidkanker te onderzoeken.

Effecten van immuunsuppressiva op huidmodellen

In hoofdstukken 3 en 4 zijn de effecten van immuunsuppressiva op de epidermis en reactie van de huid op UV-blootstelling onderzocht in humane huidmodellen. De opbouw van de epidermis werd geremd door rapamycine, zichtbaar door onder andere een verminderd aantal levende cellagen en een verminderd percentage delende cellen. Het aantal cellen dat apoptotisch werd (geprogrammeerde celdood ondergaand) na UV blootstelling was verhoogd in huidmodellen met rapamycine. De apoptotische reactie na UV blootstelling werd juist geremd door cyclosporine, in overeenstemming met eerdere bevindingen. Het eiwit HIF1 α , dat een belangrijke rol speelt in het reguleren van metabole processen in een cel, accumuleerde in keratinocyten in UV bestraalde huidmodellen. Rapamycine remde deze accumulatie van HIF1 α (hoofdstuk 3). HIF1 α kan apoptotische reacties van cellen beïnvloeden en kan daarom betrokken zijn bij het pro-apoptotische effect van rapamycine in huidmodellen. In tegenstelling tot cyclosporine kan rapamycine dus de vorming van kwaadaardige cellen ondervloed van UV tegengaan door de groei te remmen en door de sterfte onder beschadigde cellen op te voeren.

Immuunsuppressiva en UV-geïnduceerde p53 mutaties en mutant-p53 celclusters

P53 mutaties zijn vroege gebeurtenissen in het ontstaan van huidkanker. Om effecten van immuunsuppressiva op het ontstaan van deze mutaties te onderzoeken hebben we mutatiefrequenties in p53 bepaald in muizenhuid die gedurende 10 weken was blootgesteld aan UV, nog voordat tumoren ontstonden (hoofdstuk 4). Door middel van deep-sequencing (hiermee wordt de sequentie van miljoenen DNA moleculen tegelijk bepaald) is bepaald dat veel cellen een gemuteerd allel van p53 bevatten (naar schatting 20%). Er was geen effect van immuunsuppressiva op de mutatiefrequenties.

In tegenstelling tot deze mutatiefrequenties hadden immuunsuppressiva wel effect op de ontwikkeling van mutant-p53 celclusters. Cyclosporine en azathioprine versnelden de ontwikkeling hiervan in muizen, terwijl rapamycine deze juist vertraagde (hoofdstukken 3 en 4). De discrepantie tussen de effecten van immuunsuppressiva op p53 mutatiefrequenties in de huid en de ontwikkeling van mutant-p53 celclusters wordt verderop in dit hoofdstuk behandeld.

Immuunsuppressiva versnelden huidkankerontwikkeling niet

Effecten van immuunsuppressiva op UV-geïnduceerde huidkanker zijn bepaald in muizen die dagelijks zijn blootgesteld aan UV en die immuunsuppressiva via het voer kregen

toegediend (**hoofdstukken 2 en 4**). Onverwacht bleek dat geen van de immuunsuppressiva de huidkankerontwikkeling versnelde. Muizen op cyclosporinedieet vertoonden zelfs een vertraagde huidkankerontwikkeling. Epidermale proliferatie was niet verminderd door cyclosporine, waardoor het onwaarschijnlijk is dat dit de oorzaak was van de vertraagde tumorontwikkeling. Eerdere studies hebben verschillende effecten van cyclosporine op huidkanker laten zien, zowel vertragend als versnellend. Rapamycine had geen effect op het ontstaan van de eerste kleine tumoren maar remde de ontwikkeling van grote tumoren (**hoofdstuk 2**). Dit kan veroorzaakt zijn door de bekende tumorgroei remmende eigenschappen (remming van bloedvatvorming) van rapamycine.

Rapamycine verandert het p53 mutatiespectrum in huidkankers

Het vermoeden dat rapamycine selectief apoptose induceert in p53-gemuteerde cellen en daarom tumorontwikkeling remt lijkt onwaarschijnlijk, omdat rapamycine het ontstaan van kleine tumoren (<1mm) niet remt (**hoofdstuk 2**). Om andere lokale effecten van immuunsuppressiva te onderzoeken is het spectrum van mutaties in het p53 gen bepaald van tumoren. Normaliter is de meerderheid van deze mutaties van het UV-type (C>T transitie op een dipyrimidineplaats), maar in de tumoren van muizen op rapamycinedieet was dit sterk veranderd. Een grote verschuiving in het type mutaties was opgetreden waardoor de meerderheid van de mutaties niet van het UV-type waren. Deze verandering in mutaties kan het gevolg zijn van een verhoogd niveau reactief zuurstof. In tumoren van muizen op een combinatiedieet van rapamycine en MMF was het mutatiespectrum echter onveranderd ten opzichte van controles, wat veroorzaakt kan zijn door het antioxidante effect van MMF. In **hoofdstuk 3** hebben we laten zien dat dit veranderde mutatiespectrum niet optrad in kleine tumoren en mutant-p53 celclusters van muizen op rapamycinedieet. Het veranderde mutatiespectrum is daarom een late gebeurtenis in tumorontwikkeling die pas optreedt na de ontwikkeling van kleine tumoren, of veroorzaakt wordt door een selectiemechanisme waardoor alleen een specifieke selectie van kleine tumoren kon uitgroeien. Aangezien ongevoeligheid voor rapamycine kan worden verkregen door verhoogde oxidatieve stress is het denkbaar dat alleen tumoren met verhoogde oxidatieve stress snel kunnen groeien, waarbij ook het veranderde mutatiespectrum in grote tumoren is ontstaan.

De meeste mutant-p53 celclusters hebben niet de potentie om zich tot huidkanker te ontwikkelen

In hoofdstukken 2, 3 en 4 worden de effecten van immuunsuppressiva op verschillende stadia in huidkankerontwikkeling beschreven. Er zijn discrepanties tussen effecten van immuunsuppressiva in de verschillende stadia:

- Geen van de immuunsuppressiva had effect op het percentage cellen met gemuteerd p53 in dagelijks UV-bestraalde huid (tumorvrije huid).
- De ontwikkeling van mutant-p53 celclusters werd verlaagd door rapamycine en verhoogd door cyclosporine.
- Tumorontwikkeling werd door cyclosporine vertraagd.
- Tumorgroei werd door rapamycine vertraagd.

Met name de effecten op ontwikkeling van mutant-p53 celclusters zijn anders dan verwacht kan worden op basis van het bestaande algemene model voor huidkankerontwikkeling door UV. Daarbij worden mutant-p53 celclusters als directe voorlopers van huidtumoren beschouwd met gelijke ontwikkelingsdynamiek. Dit is vooral duidelijk bij cyclosporine, waarbij geen effect op het percentage p53 gemuteerde cellen optreedt, de ontwikkeling van mut-53 celclusters wel verhoogd is, maar tumorontwikkeling vertraagd is. Ook de resultaten voor rapamycine laten zo'n discrepantie zien voor mutant-p53 celclusters. Aan de hand van deze resultaten concluderen we dat ontwikkeling van mutant-p53 celclusters niet direct samenhangt met huidkankerontwikkeling, maar dat deze celclusters naast en onafhankelijk van huidtumoren ontstaan uit een grote poule van mutant-p53 cellen.

Experimenteel protocol is bepalend voor het effect van cyclosporine op huidkankerontwikkeling door UV

In het verleden zijn verschillende muizenstudies gedaan om de effecten van immuunsuppressiva op huidkankerontwikkeling te onderzoeken. Studies die onderzoek naar het effect van cyclosporine op huidkanker beschrijven hebben verschillende uitkomsten. Eén van de eerste studies laat zien dat huidkankerontwikkeling verhoogd wordt door cyclosporine en een recente studie beschrijft dat cyclosporine ook de groei van tumoren verhoogt. Een andere studie laat daarentegen zien dat cyclosporine tumorontwikkeling remt, in overeenstemming met hoofdstuk 4 van dit proefschrift. Al deze studies maken gebruik van dezelfde stam haarloze muizen en huidkankerinductie door UV, ze verschillen echter in het protocol waarmee de cyclosporine wordt toegediend en in welke periode de muizen worden blootgesteld aan UV. Hoofdstuk 5 beschrijft de verschillen tussen drie verschillende protocollen in de effecten van cyclosporine op huidkankerontwikkeling door UV. Cyclosporine had geen

effect op huidkankerontwikkeling in muizen die op cyclosporinedieet werden gezet na een periode van UV blootstelling. Daarentegen vond verhoogde tumorontwikkeling plaats in muizen die cyclosporine toegediend kregen door middel van gavage (sondevoeding). Dit bevestigde dat cyclosporine de huidkankerontwikkeling door UV kan bevorderen. Er was geen verschil in huidkankerontwikkeling tussen muizen die UV-bestraald werden na gavage op het moment dat cyclosporine bloedniveaus piekten of op het moment dat ze laag waren. Deze experimenten geven aan dat bloedniveaus van cyclosporine op het moment van UV blootstelling niet van belang zijn op het huidkankerbevorderende effect. Het toedienen van cyclosporine in bolus doseringen (via gavage) in plaats van een gelijkmatige toediening via het voer resulteerde in een versnelde huidkankerontwikkeling. Hieruit blijkt dat de manier van toediening van immuunsuppressiva belangrijk kan zijn voor effecten op de ontwikkeling van huidkanker. Maar zelfs de toediening van cyclosporine in bolus doseringen resulteerde niet in een verhoogde huidkankerontwikkeling in de mate die bij transplantatiepatiënten wordt gezien (60- tot 100-voudige toename). Dit suggereert dat het muismodel dat gebruikt is niet optimaal was, omdat muizen anders reageren dan mensen (bijvoorbeeld langzamer herstel van beschadigd DNA) of omdat het model niet compleet is door bijvoorbeeld het ontbreken van een orgaantransplantaat.

Ontwikkelingen

De studies in dit proefschrift bevestigen het potentieel dat rapamycine (of analogen zoals everolimus) heeft om het verhoogde huidkankerrisico bij transplantatiepatiënten te verminderen. Remming van tumorgroei door rapamycine-analogen met minder bijwerkingen dient verder onderzocht en ontwikkeld te worden. Dit zou voor de patiënt een verbetering op kunnen leveren.

De meerderheid van de mutant-p53 celclusters zijn geen voorlopers van plaveiselcelcarcinomen. Toch is het waarschijnlijk dat de meeste plaveiselcelcarcinomen ontstaan uit cellen met gemuteerd p53 aangezien mutatie van p53 een vroege gebeurtenis is in de ontwikkeling van deze tumoren. Een nog onbekende oncogene gebeurtenis zou echter vooraf kunnen gaan aan de p53 mutatie.

De hier beschreven studies laten zien dat de gebruikte muismodellen voor huidkankerontwikkeling door UV niet het door immuunsuppressiva verhoogde huidkankerrisico in transplantatiepatiënten nabootsen. Het is mogelijk dat het muismodel een belangrijk element mist, namelijk het transplantaat, en daarmee ook de mogelijke tolerantie hiervoor. Als belangrijk en logisch vervolg op het hier beschreven onderzoek zou dus een transplantaat

en de daarbij behorende tolerantie in het UV carcinogenese model met de haarloze muis moeten worden opgenomen.