



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Targets for personalized treatment of conjunctival melanoma

Cao, J.

Citation

Cao, J. (2017, December 7). *Targets for personalized treatment of conjunctival melanoma*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/57790>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/57790>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/57790> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Cao, Jinfeng

Title: Targets for personalized treatment of conjunctival melanoma

Date: 2017-12-07

SAMENVATTING

Hoewel conjunctiva melanoom (CM) een zeldzame aandoening is, is de medische zorg voor de aandoening veelomvattend: zowel het behandelen van de primaire tumor, het voorkomen van lokale recidieven, als het voorkomen van regionale metastasen en metastasen op afstand is van belang. Het doel van dit proefschrift is tweeledig. Enerzijds gaat het om het verkrijgen van een beter inzicht in de biologie van CM, anderzijds gaat het om het ontwikkelen van doelgerichte gepersonaliseerde therapie, aangezien gangbare chemotherapie niet goed werkt bij gemetastaseerd CM. In tegenstelling tot de gebruikelijke principes van “één ziekte, één doel” en “one-size-fits-all” voor behandelingen, betreft gepersonaliseerde therapie een uitgebreid persoonlijk profiel, en maakt het meerdere behandelstrategieën mogelijk waaruit een beste optie kan worden gekozen. Om dit doel te bereiken, heb ik experimenten uitgevoerd om aangrijpingspunten te identificeren voor de behandeling van gemetastaseerd CM en vervolgens heb ik de effectiviteit en veiligheid van farmacologische middelen, die al gebruikt worden bij andere maligniteiten, onder laboratoriumomstandigheden bij CM onderzocht.

Begrip van de moleculaire mechanismen van CM kan leiden tot de ontdekking van aangrijpingspunten voor behandeling (“therapeutische targets”) en verklaren hoe tumorcellen ontkomen aan opruiming door het immuunsysteem (“immune surveillance”). Hiermee hopen we de levensverwachting van patiënten met CM te verbeteren. Hoewel er nog vele uitdagingen moeten worden overwonnen, zou het mooi zijn als ons pre-klinische onderzoek resulteert in klinisch toepasbare behandelopties.

Kanker is een genetische aandoening. Enerzijds kunnen mutaties in proto-oncogenen groei-stimulerende ‘pathways’ aanzetten en anderzijds kunnen mutaties in ‘tumor-suppressor genen’ de natuurlijke rem op celdeling ongedaan maken waardoor tumorcellen ongecontroleerd kunnen delen. Het herkennen van, en het aangrijpen op

de juiste mutaties is een wezenlijk onderdeel van ‘targeted’ therapie; tevens om het risico op bijwerkingen te minimaliseren. In **Hoofdstuk 2** hebben we via immunohistochemie (IHC) met specifieke antilichamen aangetoond dat *BRAF* V600E mutaties vaak voorkomen in conjunctivale nevi (19%) en CM (26%). Die specifieke mutatie vonden we echter niet in primair verworven melanose (primary acquired melanosis, PAM) van de conjunctiva, met of zonder atypie. Aangezien CM veelal vanuit PAM met atypie ontstaat, en zelden vanuit een nevus, is het aannemelijk dat alleen een *BRAF* V600E mutatie onvoldoende is voor tumorvorming en dat andere mutaties in oncogenen en/of tumor suppressor genen nodig zijn voor de ontwikkeling van CM. Bovendien zagen wij expressie van gefosforyleerd ERK en gefosforyleerd AKT in conjunctivale melanocytair laesies, wat wijst op een activatie van de PI3K/AKT pathway, hetgeen een target voor doelgerichte therapie kan zijn. Onze *in vitro* experimenten toonden aan dat de *BRAF* inhibitoren Vemurafenib en Dabrafenib de groei van cellijnen met de *BRAF* V600E mutatie remmen, terwijl de MEK inhibitor MEK162 en AKT inhibitor MK2206 de proliferatie van CM cellijnen remmen, ongeacht de mutatiestatus. Bovendien laat de combinatie van MEK162 en MK2206 een synergistisch effect zien op cel-overleving en celcyclus, en resulteert de combinatie in meer celdood dan wanneer deze middelen apart worden toegepast. Onze bevindingen tonen aan dat klinisch onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van deze ‘small molecule inhibitors’ in CM nodig is.

Naast genetische veranderingen zijn ook epigenetische veranderingen van belang voor de regulering van de celcyclus en overleving van tumorcellen. Epigenetica omvat veranderingen aan het genoom die geen wijziging van de volgorde van nucleotiden betreft. Epigenetische veranderingen spelen een belangrijke rol in de transformatie van normale cellen tot tumorcellen: tumor suppressor genen zijn vaak geremd door epigenetische veranderingen bij kanker. Van verschillende behandelingen die gericht zijn op epigenetische veranderingen is bewezen dat zij effectief zijn bij de preventie, detectie en behandeling van kanker [1,2]. Enhancer of

zeste homolog 2 (EZH2) is een onderdeel van de ‘polycomb repressive complex 2’ (PRC2) familie. Overexpressie van EZH2 is in meerdere kankersoorten aangetoond en is geassocieerd met een slechte overleving [3]. Van bepaalde middelen die gericht zijn op epigenetische veranderingen is in sommige kankersoorten zowel *in vitro* als *in vivo* de effectiviteit aangetoond [4]. In **Hoofdstuk 3** laten we zien dat overexpressie van EZH2, net zoals in huidmelanoom en prostaatkanker, regelmatig voorkomt in primair CM en we tonen aan dat EZH2 expressie is geassocieerd met tumordikte. EZH2 komt daarentegen niet tot expressie in normale conjunctivale melanocyten. Vervolgens hebben we *in vitro* experimenten uitgevoerd waarbij we middels genetische ‘knock-down’ en farmacologische inhibitie EZH2 hebben geïnactiveerd. We tonen aan dat beide manieren resulteren in een significante vermindering van de levensvatbaarheid van tumorcellen, een vermindering van kolonievorming van tumorcellen in celweek, een vermindering van expressie van EZH2-gemedieerde eiwitten en leiden tot blokkade van de celdeling. Hoewel de EZH2-inhibitor GSK503 leidt tot een vergelijkbare mate van apoptose als EZH2 depletie, resulteert EZH2 inhibitie met de inhibitor UNC1999 niet in apoptose in alle CM cellijnen, wat suggereert dat GSK503 bijkomende effecten heeft. Meer nog, GSK503 remt de groei van CM cellen in een zebra-vismodel bij een goed te verdragen concentratie. Onze bevindingen suggereren dat aangrijpen op EZH2 een nieuwe therapeutische optie voor patiënten met CM kan zijn.

Het gebruik van diermodellen voor onderzoek naar kanker heeft verschillende voordelen. Het biedt onderzoekers de mogelijkheid om factoren die de resultaten van het onderzoek kunnen beïnvloeden, te controleren en/of te excluderen. In zeldzame maligniteiten als CM is er een gebrek aan voldoende humaan weefsel wat de mogelijkheden voor onderzoek beperkt. Diermodellen kunnen extra mogelijkheden bieden om het gedrag van tumoren en therapeutische strategieën te onderzoeken. Momenteel zijn er slechts enkele diermodellen die geschikt zijn voor onderzoek naar CM. De afgelopen jaren is er vooruitgang geboekt in de behandeling van primair CM. Wij hebben als doel om potentiële behandelingen voor metastasen op afstand

te ontwikkelen. In **Hoofdstuk 4** hebben we 3 primaire CM cellijnen subconjunctivaal geïnjecteerd in ‘nonobese diabetic (NOD)/severe combined immunodeficiency (SCID) IL-2 r^{null} ’ muizen. We detecteerden in alle muizen primaire tumorgroei zonder ontwikkeling van metastasen. Daarom hebben we vervolgens een *in vivo* passage techniek toegepast: tumorcellen verkregen uit de subconjunctivale xenotransplantaten werden geïmplanteerd in de subconjunctivale ruimte van hetzelfde type immunodeficiënte muizen. Dit resulteerde uiteindelijk in een aanzienlijk aantal longmetastasen. Omdat CM vaak naar de longen metastaseert, komt dit muismodel overeen met het natuurlijke gedrag van CM. Een ander voordeel van dit muismodel is dat in de xenotransplantaten dezelfde mutaties werden gevonden als in de bijbehorende cellijnen. Dat is vooral van belang voor het testen van nieuwe middelen die gericht zijn tegen deze mutaties. Ons onderzoek kan leiden tot nieuwe mogelijkheden om uitzaaiingen te voorkomen, en verder om longmetastasen te behandelen. We moeten echter beseffen dat de afwezigheid van een functionerend immuunsysteem in immunodeficiënte muizen de mogelijkheden beperkt om de immunologie van CM te bestuderen.

De ontdekking van immunologische ‘checkpoint remmers’ heeft geleid tot een nieuw tijdperk in de gepersonaliseerde behandeling van gemetastaseerd huidmelanoom, niet-kleincellig longcarcinoom, blaaskanker en nierkanker [5]. Er is veel inspanning geleverd om deze bevindingen te vertalen naar klinisch toepasbare behandelingen. Omdat targeted therapie resistentie kan opwekken, is veel van het huidige onderzoek gericht op het stimuleren van de functie van T cellen, om zo tumorcellen te doden. De immunologische checkpoint moleculen ‘cytotoxic T lymphocyte antigen 4’ (CTLA4) en ‘programmed death 1’ (PD-1) spelen een essentiële rol in de remming van de T cel signaaloverdracht. Antilichamen die deze twee moleculen blokkeren zijn effectief gebleken in de behandeling van gevorderde maligniteiten en hebben geleid tot een goede klinische respons [6]. De succesvolle blokkade van de PD-1/PD-L1 as is mogelijk afhankelijk van PD-L1 expressie op de tumorcelmembraan [7,8]. Onlangs is onderzocht of PD-L1 expressie op tumor-

infiltrerende lymfocyten (TIL) een voorspellende waarde heeft voor het klinische effect van checkpointremmers [9]. In **Hoofdstuk 5** hebben we ons afgevraagd of immunologische checkpoint blokkade toegepast kan worden in CM, hebben we de expressie van PD-L1 in CM bestudeerd en hebben we de relatie met de tumor-omgeving bestudeerd. We laten zien dat PD-L1 tot expressie komt op tumorcellen bij 19% van de primaire CM, en op stromale cellen (vooral CD68⁺CD163⁺ M2 macrofagen) bij 59% van de primaire CM. Verder laten we zien dat PD-L1 expressie op tumorcellen gecorreleerd is met de ontwikkeling van metastasen op afstand en een slechte prognose. Opmerkelijk is dat de dichtheid van TILs een negatieve associatie met tumorgrootte laat zien: grotere tumoren hebben minder TILs dan kleinere tumoren. Dit suggereert dat tumoren beter groeien als er minder infiltrerende immuuncellen zijn. Deze resultaten geven aan dat blokkade van de PD-1/PD-L1 as mogelijk effectief kan zijn bij patiënten met gevorderde CM.

Kankercellen gebruiken verschillende manieren om te ontkomen aan herkenning en vernietiging door het immuunsysteem. Momenteel zijn er 7 parameters bekend die betrokken zijn bij kanker-immuunsysteem interacties: de algemene toestand van het immuunsysteem, ‘tumor foreignness’ (de mate waarin een tumor als lichaamsvreemd wordt gezien door het immuunsysteem), de gevoeligheid van tumoren voor het immuunsysteem (human leukocyte antigen (HLA) expressie en IFN- γ gevoeligheid), de afwezigheid van remmend tumormetabolisme, de afwezigheid van remmende stoffen en de afwezigheid van checkpoints [11]. De activatie van cytotoxische T lymfocyten (CTL) door antigeen-presenterende cellen vereist de aanwezigheid van HLA klasse I-geassocieerde peptiden. Tumorcellen hebben vaak een lage HLA expressie om zo minder ‘zichtbaar’ te zijn voor het immuunsysteem. Een correlatie tussen HLA expressie en klinische effectiviteit van anti-PD-1 of anti-CTLA-4 immunotherapieën is alleen nog niet aangetoond. Het bestuderen van de gevoeligheid van tumoren voor immunotherapie zal bijdragen aan inzicht in de manier waarop resistentie voor immunotherapie ontstaat en zal helpen bij het identificeren van patiënten het beste reageren op T cel gemedieerde

behandelingen. Bovendien wordt een verminderde expressie van HLA klasse I in vele maligniteiten als een biomarker van slechte prognose gezien [12]. In **Hoofdstuk 6** hebben we daarom de expressie van HLA klasse I bestudeerd en de correlatie met bepaalde klinische parameters van CM geanalyseerd. Immunofluorescentie laat in veel gevallen een verminderde expressie van HLA klasse I zien en toont een associatie tussen expressie van HLA klasse I met de aanwezigheid van sommige TILs, maar niet met de PD-L1/PD-1 status. Ook laten we zien dat tumoren met een grotere dikte vaak weinig tot geen HLA klasse I expressie vertonen. T cel effector cytokines, zoals IFN- γ , zijn cruciale promotoren van HLA expressie. De associatie tussen expressie van HLA klasse I en TILs suggereert dat in dikkere tumoren minder TILs IFN- γ produceren, waardoor de HLA expressie lager is. Hierdoor is de tumor minder gevoelig voor het immuunsysteem en kan deze ongestoord groeien. We hebben de invloed van IFN- γ *in vitro* getest door CM cellijnen te incuberen met IFN- γ . Dit bootst demicro-omgeving van de tumor na en stelt ons in staat de moleculaire veranderingen te bestuderen. We zagen inderdaad dat incubatie met IFN- γ resulteerde in een verhoging van de mRNA en membraaneiwit expressie van HLA klasse I en HLA-geassocieerde moleculen. *In vivo* resultaten lieten zien dat expressie van HLA klasse I behouden bleef in het muis-xenotransplantaat. Samengevat suggereren onze bevindingen dat een verminderde expressie van HLA klasse I kan bijdragen aan de manier waarop CM herkenning door het immuunsysteem ontloopt. Het is noodzakelijk de expressie van HLA klasse I op te hogen om de werkzaamheid van T-cel gebaseerde immuuntherapie te verhogen.

Conclusies en toekomstperspectieven

CM is een aandoening die in de vroege fase vaak wordt gemist door huisartsen vanwege de geringe tumorgrootte. Oogartsen behandelen de primaire maligniteit en bepalen in samenwerking met patholoog-anatomen de daadwerkelijke diagnose en verdere therapie. Frequentie lokale recidieven verminderen de kwaliteit van leven, terwijl metastasen kunnen resulteren in de dood. Meer samenwerking tussen oogartsen, patholoog-anatomen, oncologen, genetici en biochemici is zodoende

nodig om betere opties te ontwikkelen voor de preventie en behandeling van metastasen van CM. Begrip van de tumorbiologie en tumor-immunologie is hierbij een lastige maar essentiële voorwaarde. Gangbare chemotherapie is niet effectief bij sommige maligniteiten en kan ernstige bijwerkingen hebben; er moet daarom meer aandacht besteed worden aan gepersonaliseerde behandelingen. Gelukkig laten meerdere studies naar gepersonaliseerde behandelingen veelbelovende klinische resultaten zien. Het verdient de voorkeur om bij patiënten met kanker de conditie van de patiënt te evalueren en een zorgvuldige beslissing over interventie en therapie te maken.

In dit proefschrift hebben we de biologische en immunologische mechanismen van CM bestudeerd. We hebben aangetoond dat er in CM veelal verminderde expressie van HLA klasse I optreedt, wat mogelijk bijdraagt aan het ontkomen van tumorcellen aan het immuunsysteem. Onze studies tonen aan dat *BRAF* en *NRAS* mutaties, *EZH2* overexpressie en PD-L1 expressie aangrijpingspunten voor gepersonaliseerde therapie kunnen zijn. We laten zien dat het muismodel van CM metastasen de humane maligniteit goed nabootst en verdere pre-klinische analyses naar CM kan bevorderen. Onze bevindingen ondersteunen de ‘knowledge-based’ behandelingen voor deze aandoening. Ongetwijfeld zullen steeds meer potentiële targets ontdekt worden door fundamenteel (oncologisch) onderzoek. Toekomstige studies zullen zich naar waarschijnlijkheid richten op de combinatie van doelgerichte therapie van meerdere moleculaire pathways en immuuntherapie door activatie van immuuncellen. Wij hopen dat ons onderzoek nieuwe therapeutische opties biedt voor de behandeling van CM en de levensverwachting van patiënten met CM verbetert.

