



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Systems biology as a compass to understand cancer-immune interactions in humans

Roelands, J.

Citation

Roelands, J. (2022, June 29). *Systems biology as a compass to understand cancer-immune interactions in humans*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3420985>

Version: Not Applicable (or Unknown)
License: [Leiden University Non-exclusive license](#)
Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3420985>

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



Appendices

Nederlandse samenvatting
List of publications
Curriculum Vitae
Dankwoord



Nederlandse samenvatting

Studies op het gebied van immuno-oncologie hebben aangetoond dat het immuunsysteem in staat is een reactie tegen kanker op te wekken. De prognostische waarde van immuunactiviteit bij verschillende kankersoorten, waaronder borst- en darmkanker, toont de invloed van het immuunsysteem op het ziekteproces aan¹⁻³. Immunotherapie richt zich op het versterken van deze immuunreacties tegen kanker. Een deel van de kankerpatiënten heeft baat bij dergelijke behandeling, maar bij een groot deel van de patiënten (60-80%) reageert de tumor (nog) niet op immunotherapie⁴. Om het bereik van immunotherapeutische strategieën uit te breiden, is het noodzakelijk om de mechanismen te begrijpen die zorgen voor een effectieve antitumor-immuunreactie. Er zijn verschillende factoren beschreven die de ontwikkeling van antitumor-immuniteit bij kankerpatiënten beïnvloeden, waaronder het genetische programma van de tumor, de genetische code van de patiënt⁵ en omgevingsfactoren zoals het microbioom^{6,7}. Deze factoren reguleren waarschijnlijk gezamenlijk antitumor-immuunreacties⁷. In dit proefschrift wordt onderzocht hoe verschillende factoren een rol spelen bij de opbouw van antitumor-immuunreacties. Een systeembioïologische benadering is gebruikt om te definiëren welke onderliggende variabelen de micro-omgeving van een tumor bepalen en om te onthullen welke mechanismen de tumor gebruikt om te ontsnappen aan het immuunsysteem.

Moleculaire determinanten van immuunactivatie bij darmkanker

De progressie van darmkanker wordt beïnvloed door een dynamisch samenspel tussen kankercellen en alle andere cellen in de micro-omgeving (inclusief tumorstroma en infiltrerende immuuncellen) van de tumor. De samenstelling van de micro-omgeving van de tumor verschilt aanzienlijk tussen patiënten⁸. Een deel van de tumoren heeft veel infiltrerende immuuncellen en een ontwikkelde antitumor-immuunreactie, terwijl in andere tumoren een dergelijke immuunreactie niet duidelijk zichtbaar is. In **Hoofdstuk 2** hebben we een literatuurstudie gedaan om uiteen te zetten welke factoren het effect van immuuncellen op de tumor bepalen. Het type, de locatie en de dichtheid van tumorinfiltrerende lymfocyten (TILs) bepalen in combinatie met hun activatiestatus het effect op de prognose van de patiënt^{1,9}.

Om de verschillen tussen tumoren beter te begrijpen, worden tumoren vaak geclassificeerd op basis van specifieke kenmerken. Bij darmkanker wordt tegenwoordig veel gebruik gemaakt van de Consensus Molecular Subtypes (CMS), waarbij darmtumoren in vier categorieën (CMS1, 2, 3 en 4) worden ingedeeld. Deze classificatie is gebaseerd op het genexpressie profiel van de mix van kankercellen, immuuncellen, fibroblasten, en alle andere cellen in de micro-omgeving. In **Hoofdstuk 2** hebben we een overzicht gegeven van verschillende factoren die een rol spelen bij het ontwikkelen van een antitumor-immuunreactie per CMS. CMS1-tumoren vertonen een actieve, Th1-georiënteerde immuunactivatie, die vaak wordt toegeschreven aan microsatellietinstabiliteit (MSI) die wordt waargenomen bij CMS1-tumoren. De verhoogde mutatiebelasting en het aantal vermeende neo-antigenen in deze context zou leiden tot herkenning van neo-antigenen door T-cellen. Aan de andere kant wordt de micro-omgeving van CMS4-tumoren gekenmerkt door transformerende groeifactor- β (TGF- β)-signalering en een verhoogde aanwezigheid van fibroblasten. De immuunonderdrukkende rol van TGF- β zou een

effectieve immuunactivatie tegen de tumor voorkomen¹⁰⁻¹³. Tumoren van CMS2- en CMS3-subtypes vertonen een "koud" immuunfenotype, waarbij de infiltratie van immuuncellen minimaal is. Het mechanisme van ontsnapping aan het immuunsysteem in deze subtypes kan worden toegeschreven aan tumor-intrinsieke eigenschappen die immuunvermijding kunnen creëren.

We redeneerden dat in principe alle darmkankers vatbaar zouden kunnen worden gemaakt voor immuuntherapie. Omdat de factoren die de micro-omgeving beïnvloeden verschillend zijn tussen deze CMS-groepen, hebben we voorgesteld dat voor elk CMS een verschillende strategie voor immuuntherapie nodig is. CMS1-tumoren vertegenwoordigen bijvoorbeeld optimale kandidaten voor behandeling met immuuncheckpointremmers, omdat in deze tumoren veel T-cellen bevatten die opnieuw geactiveerd kunnen worden door het opheffen van de remming door checkpoint-moleculen. Een andere strategie om het immuunsysteem opnieuw te activeren kan worden overwogen voor CMS4-tumoren, bijvoorbeeld door de combinatie van remming van TGF- β en remming van immuuncheckpoints.

Om de complexiteit van dikkedarmkanker beter in kaart te brengen, hebben we in een uitgebreide studie gedaan waarbij we tumor-, immunologische en microbiële kenmerken hebben bestudeerd (**Hoofdstuk 3**). Op stukjes tumor- en normaal weefsel van 348 darmkanker patiënten hebben we genexpressie bepaald door middel van RNA-sequencing, genetische veranderingen in het DNA via exoomsequencing, aanwezigheid van micro-organismen door middel van 16S rDNA-sequencing en het profiel van de T-cell receptoren (TCR) door middel van TCR-sequencing. Door combinatie van al deze -omics data, was het mogelijk om zowel gastheer- als tumorerelateerde processen vast te stellen in relatie tot het klinisch beloop van de patiënt.

In dit hoofdstuk hebben we laten zien dat patiënten met darmtumoren met een hoge expressie van 20 specifieke genen, samen de Immunologische Constante van Afstoting (de Immunologic Constant of Rejection, ICR) genoemd, een betere overleving hebben. Deze 20 genen weerspiegelen immuunactiviteit gekenmerkt vanuit interferon-gestimuleerde genen, specifieke chemokines (*CCL3-5* and *CXCL9-11*), T-helper 1 signalering, en productie van cytotoxische effector moleculen. Clustering op basis van expressie van deze ICR-genen classificeerde tumoren in ICR High, (immuun "heet"), ICR Medium en ICR Low (immuun "koud") groepen.

Immuunactivatie wordt in het algemeen toegeschreven aan darmtumoren van het CMS1 subtype. Onze data liet zien dat er naast CMS1 tumoren bij een groot deel van CMS4 tumoren ook sprake is van immuunactivatie. Hoewel het CMS4 subtype geassocieerd is met een slechtere uitkomst, hebben de CMS4-tumoren met immuunactivatie wel een betere overleving, vergelijkbaar met ICR High tumoren van andere subtypes. Dit suggereert dat ook in CMS4-tumoren een effectieve antitumor-immunreactie kan ontstaan.

Eerder is aangetoond dat slechts een klein deel van de T-cellen in de tumor daadwerkelijk tumorantigenen kan herkennen (~ 10%)¹⁶⁻¹⁸. De meeste T-cellen in de tumor worden daarom beschouwd als "omstandert-T-cellen" waarvan niet duidelijk is hoe en of deze bijdragen aan antitumorimmunitet¹⁷. Dit roept de vraag op, of het meten van totaal aantal T-cellen of bijhorende genexpressieprofielen, accuraat antitumor-immuunactiviteit kan bepalen. Ons werk beschreven in **Hoofdstuk 3**, toonde een bijna perfecte correlatie aan tussen ICR-score en de T-cell klonaliteit zoals bepaald door middel van TCR-sequencing. Dit suggereert dat klonale expansie van T-cellen

gepaard gaat met verhoogde expressie van ICR-genen en deze marker inderdaad kan worden gebruikt als surrogaat voor antitumoractiviteit. Hiernaast hebben we in dit hoofdstuk een nieuwe marker voorgesteld die de mate van de genetische immuno-editing (GIE) samenvat. Deze marker is gebaseerd op het aantal geobserveerde neoantigenen ten opzichte van het aantal niet-synonieme DNA-mutaties. Onze multi-omics-aanpak toonde aan dat immuunactivatie, uitbreiding van TCR-klonen en genetische immuno-editing parallelle biologische processen zijn die verband houden met een gunstige klinische uitkomst.

Tenslotte hebben we in deze studie de relatie tussen aanwezigheid van micro-organismen en immuunreacties in de tumor onderzocht. We vonden associaties tussen immuuneigenschappen van de tumor, gebaseerd op genexpressie profielen, en aanwezigheid van specifieke tumor-geassocieerd micro-organismen. Daarnaast waren specifieke microbiële soorten geassocieerd met overleving, onafhankelijk van het immuunprofiel van de tumor. Validatie van deze associaties is vereist en aanvullend onderzoek zal nodig zijn om een mechanistische link te identificeren.

Immuunactivatie bij borstkanker

Genexpressieprofielingsstudies hebben onze kennis over immuunreacties tegen kanker verbeterd. Onderzoekers worden sterk aangemoedigd en vaak verplicht om hun datasets te delen tijdens de publicatie van hun onderzoeksresultaten. De grote hoeveelheid gegevens vormt een belangrijke bron voor toekomstig onderzoek die niet voorzien was op het moment van publicatie of niet het hoofddoel was van de oorspronkelijke onderzoeken. Om hergebruik van eerder gepubliceerde datasets te vergemakkelijken en te stimuleren is eerder een interactieve webapplicatie ontwikkeld, de "Gene Expression Browser" (GXB)¹⁹. In **Hoofdstuk 4** beschrijven we een verzameling van 13 openbare datasets met genexpressie data van in totaal 2142 borstkanker patiënten²⁰. Deze datasets hebben wij geannoteerd met verschillende immuunrelateerde classificaties en geüpload naar GXB. **Hoofdstuk 4** beschrijft de samenstelling, annotatie en harmonisatie van deze datasets en demonstreert het nut van GXB door middel van voorbeelden. Om de expressie van een gen van belang te onderzoeken, vergeleken we de expressie van humaan leukocytenantigeen G (*HLA-G*) tussen ICR-groepen. In elk van de 13 datasets werd een verhoogde *HLA-G*-expressie waargenomen in borsttumoren met een hoge expressie van ICR-genen. Naast het onderzoeken van een gen, maakt GXB ook differentiële genexpressieanalyse tussen specifieke groepen mogelijk. Als voorbeeld werd de genranklijst van genen met het grootste verschil in genexpressie tussen "Immune Benefit Status" groepen geselecteerd. Ten slotte werd gedemonstreerd hoe de overlap-functie van GXB de relatie tussen verschillende categorische variabelen visualiseert.

De klinische uitkomst van borstkanker wordt voor een deel bepaald door de (voorouderlijke) afkomst van patiënten, waarbij dit ziektebeloop slechts gedeeltelijk kan worden toegeschreven aan sociaaleconomische factoren^{21,22}. Eerdere studies hebben een verhoogde incidentie gemeld van het agressievere triple-negatieve borstkanker subtype bij patiënten van Afrikaanse afkomst (AA)²³⁻²⁷. In **Hoofdstuk 5** hebben we de verschillen op basis van genexpressie onderzocht tussen tumoren van patiënten met AA en die met een Europese afkomst (EA) door analyse van de borstkankerdataset van The Cancer Genome Atlas (TCGA). Een verschil in overleving tussen EA

en AA werd specifiek waargenomen bij tumoren van een specifiek moleculair subtype, het BasalMyo-subtype²⁸. Het BasalMyo-subtype is verrijkt voor genexpressie profielen van basale epitheelcellen en myoepitheelcellen. Onze analyse was gefocust op eigenschappen binnen dit subtype die kunnen bijdragen aan voorouders-geassocieerde verschillen in overleving. We ontdekten dat verschillen in overleving van patiënten met BasalMyo-tumoren nog duidelijker waren als de tumoren een immuun-"koud" fenotype vertoonden, gedefinieerd door lage ICR-genexpressie. Een verlaagde hoeveelheid regulerende T-cellen en T-helper type 2-cellen werd waargenomen bij patiënten met AA, die beide gerelateerd waren aan een slechtere uitkomst bij AA-patiënten. Analyse van 54 kankergelateerde biologische processen onthulde verschillen tussen patiënten van Afrikaanse of Europese afkomst met prognostische connotatie. AMPK-signalering was een van de biologische processen die sterk verhoogd was in tumoren van patiënten van Europese afkomst. Opvallend was dat verhoogd AMPK-signalering geassocieerd was met slechtere uitkomst in patiënten van Europese afkomst, terwijl deze was geassocieerd met betere overleving in patiënten van Afrikaanse afkomst. Vanwege de kleine omvang van de lokale Arabische borstkankerdataset (n=16) waren we niet in staat om significante verschillen in moleculaire determinanten te identificeren in dit cohort. Wel is een verrijking van BasalMyo-tumoren waargenomen met een trend voor verminderde infiltratie van regulerende T-cellen en verhoging van AMPK-signalering.

Samenvattend wijzen onze bevindingen op verschillen in kankergelateerde en micro-omgevingskenmerken tussen AA en EA. Deze resultaten tonen aan dat het belangrijk is om rekening te houden met voorouder-gerelateerde moleculaire kenmerken in het onderzoek naar borstkanker en bij het op maat maken van behandeling.

Moleculaire determinanten van immuundispositie geïdentificeerd door pan-kankeranalyse

Antitumor T-helper 1 (Th-1) immuunreacties zijn in verband gebracht met gunstige uitkomst na behandeling met immunotherapie, maar niet alle kankertypen waarbij dergelijke immuunreacties plaatsvinden reageren op behandeling. In **Hoofdstuk 6** hebben we een pan-kankeranalyse uitgevoerd met gegevens van de TCGA, bestaande uit 31 verschillende kankersoorten van 9282 patiënten, om de prognostische waarde van Th-1 immuunreacties in de tumor te evalueren. De ICR werd hierbij gebruikt als marker voor Th-1 immuunactivatie. De ICR was geassocieerd met een significant verbeterde overleving voor sommige kankersoorten, waaronder invasief borstcarcinoom, huid-cutaan melanoom, endometriumcarcinoom en sarcoom, terwijl het verband hield met verminderde overleving bij andere kankersoorten zoals oogmelanoom, laaggradig glioom, adenocarcinoom van de alvleesklier en heldercellig niercelcarcinoom. Om te bepalen in welke context de ICR prognostische waarde heeft en in welke niet, hebben we systematisch de moleculaire verschillen tussen deze kankersoorten onderzocht. Onze resultaten suggereren dat de ICR in tumoren met hoge mutatielast en/of hoge proliferatie een beschermende antitumor-immuunreactie reflecteert, terwijl in tumoren die gedomineerd worden door oncogene processen dezelfde antitumor-immuunreactie geen beschermd effect biedt. In deze context is de verhoogde expressie van ICR genen waarschijnlijk een weerspiegeling van een antitumorimmuunreactie die niet in staat is om tumorcellen te elimineren door bijvoorbeeld sterke immuunonderdrukking.

In dit hoofdstuk lieten we zien dat onze bevindingen ook relevant zijn in de context van immunotherapie. Tumoren van melanoompatiënten die reageerden op behandeling met checkpointremmers hadden een hogere expressie van ICR genen in weefsels afgenomen vóór de behandeling in vergelijking met tumoren die niet reageerden op deze behandeling. De voorspellende waarde van ICR op therapeutische respons was echter beperkt tot tumoren met hoge proliferatie. Omgekeerd was de ICR alleen geassocieerd met therapeutische respons in tumoren met lage expressie van TGF- β -pathway genen, maar niet bij tumoren met hoge expressie. Deze resultaten kunnen worden gebruikt om patiëntstratificatie te verfijnen en om strategieën te optimaliseren om tumoren te bewerken om zo immuunrespons te bereiken bij een groter aantal patiënten.

Mechanismen van immuunontsnapping in de tonsillaire crypten

Naast diepgaande analyse van kankerweefsels, kunnen inzichten in mechanismen van immuunontsnapping ook worden verkregen door onderzoek van normale gezonde menselijke weefsels met immuunregulerende functies, zoals de menselijke keelamandelen. De amandelen spelen een belangrijke rol als eerste verdedigingslinie tegen vreemde pathogenen die via de mondholte het lichaam binnendringen.

Humaan papillomavirus-geassocieerde hoofd-hals plaveiselcelcarcinomen (HPV-HNSCC) vinden hun oorsprong in de amandelen. Breuken in het basaalmembraan van de tonsillaire crypten zijn nodig voor de passage van lymfocyten, maar stellen tegelijkertijd de basale cellaag van de tonsil bloot aan HPV-infectie. De schijnbare paradox van HPV-infectie en kwaadaardige transformatie van deze epitheelcellen in een lymfoïde-rijke micro-omgeving werd eerder verklaard door immuunontduiking door opregulering van PD-L1 door epitheelcellen en macrofagen in de tonsillaire crypte²⁹. In **Hoofdstuk 7** hebben we een diepgaande analyse uitgevoerd om de natuurlijke regulatiemechanismen die in de tonsillaire crypte worden geactiveerd, verder te onderzoeken. Door het genexpressie profiel van verschillende gebieden te vergelijken door middel van lasermicrodissectie in de menselijke tonsil (d.w.z. oppervlakte-epitheel, cryptepitheel en kiemcentra), identificeerden we een verrijking van myeloïde cellen in de tonsillaire crypte. We identificeerden meerdere aanvullende immuuncheckpoints, naast PD-L1, die verhoogd tot expressie werden gebracht in de crypten door myeloïde cellen. Myeloïde populaties die PD-L1, CEACAM1, VISTA en PVR samen tot expressie brengen, worden ook gevonden in HPV-HNSCC, wat suggereert dat dezelfde myeloïde celpopulaties een rol kunnen spelen bij het handhaven van een immuunonderdrukking in de micro-omgeving bij HPV-geassocieerde amandelekanker.

Referenties

1. Fridman, W.-H. *et al.* The Immune Microenvironment of Human Tumors: General Significance and Clinical Impact. *Cancer Microenviron.* **6**, 117–122 (2012).
2. Galon, J. *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* **313**, 1960–1964 (2006).
3. Danaher, P. *et al.* Pan-cancer adaptive immune resistance as defined by the Tumor Inflammation Signature (TIS): results from The Cancer Genome Atlas (TCGA). *J. Immunother. Cancer* **6**, 63 (2018).
4. Emens, L. A. *et al.* Cancer immunotherapy: Opportunities and challenges in the rapidly evolving clinical landscape. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **1990** **81**, 116–129 (2017).
5. Sayaman, R. W. *et al.* Germline genetic contribution to the immune landscape of cancer. *Immunity* **54**, 367–386.e8 (2021).
6. Helmink, B. A., Khan, M. A. W., Hermann, A., Gopalakrishnan, V. & Wargo, J. A. The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nat. Med.* **25**, 377–388 (2019).
7. Bedognetti, D., Hendrickx, W., Ceccarelli, M., Miller, L. D. & Seliger, B. Disentangling the relationship between tumor genetic programs and immune responsiveness. *Curr. Opin. Immunol.* **39**, 150–158 (2016).
8. Roelands, J. *et al.* Immunogenomic Classification of Colorectal Cancer and Therapeutic Implications. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2229 (2017).
9. Galon, J., Angell, H. K., Bedognetti, D. & Marincola, F. M. The Continuum of Cancer Immunosurveillance: Prognostic, Predictive, and Mechanistic Signatures. *Immunity* **39**, 11–26 (2013).
10. Chen, M.-L. *et al.* Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF- β signals in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 419–424 (2005).
11. Thomas, D. A. & Massagué, J. TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* **8**, 369–380 (2005).
12. van den Bulk, J., de Miranda, N. F. C. C. & ten Dijke, P. Therapeutic targeting of TGF- β in cancer: hacking a master switch of immune suppression. *Clin. Sci.* **135**, 35–52 (2021).
13. Spranger, S. & Gajewski, T. F. Tumor-intrinsic oncogene pathways mediating immune avoidance. *Oncoimmunology* **5**, (2015).
14. Guinney, J. *et al.* The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* **21**, 1350–1356 (2015).
15. Dienstmann, R. *et al.* Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 79–92 (2017).
16. Schumacher, T. N. & Scheper, W. A liquid biopsy for cancer immunotherapy. *Nat. Med.* **22**, nm.4074 (2016).
17. Simoni, Y. Bystander CD8+ T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates. *Nature* **557**, (2018).
18. Scheper, W. Low and variable tumor reactivity of the intratumoral TCR repertoire in human cancers. *Nat Med* **25**, (2019).
19. Speake, C. *et al.* An interactive web application for the dissemination of human systems immunology data. *J. Transl. Med.* **13**, (2015).
20. Roelands, J. *et al.* A collection of annotated and harmonized human breast cancer transcriptome datasets, including immunologic classification. *F1000Research* **6**, 296 (2017).
21. Albain, K. S., Unger, J. M., Crowley, J. J., Coltman, C. A. & Hershman, D. L. Racial disparities in cancer survival among randomized clinical trials patients of the Southwest Oncology Group. *J. Natl. Cancer Inst.* **101**, 984–992 (2009).
22. Newman, L. A. *et al.* Meta-analysis of survival in African American and white American patients with breast cancer: ethnicity compared with socioeconomic status. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24**, 1342–1349 (2006).
23. Kroenke, C. H. *et al.* Race and breast cancer survival by intrinsic subtype based on PAM50 gene expression. *Breast Cancer Res. Treat.* **144**, 689–699 (2014).

Appendices

24. Copson, E. *et al.* Ethnicity and outcome of young breast cancer patients in the United Kingdom: the POSH study. *Br. J. Cancer* **110**, 230–241 (2014).
25. Sweeney, C. *et al.* Intrinsic subtypes from PAM50 gene expression assay in a population-based breast cancer cohort: differences by age, race, and tumor characteristics. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **23**, 714–724 (2014).
26. Newman, L. A. & Kaljee, L. M. Health Disparities and Triple-Negative Breast Cancer in African American Women: A Review. *JAMA Surg.* **152**, 485–493 (2017).
27. Troester, M. A. *et al.* Racial Differences in PAM50 Subtypes in the Carolina Breast Cancer Study. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **110**, 176–182 (2017).
28. Mathews, J. C. *et al.* Robust and interpretable PAM50 reclassification exhibits survival advantage for myoepithelial and immune phenotypes. *Npj Breast Cancer* **5**, 1–8 (2019).
29. Lyford-Pike, S. *et al.* Evidence for a Role of the PD-1:PD-L1 Pathway in Immune Resistance of HPV-Associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res.* **73**, 1733–1741 (2013).