



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Immunosuppression in breast cancer: a closer look at regulatory T cells

Kos, K.

### Citation

Kos, K. (2023, January 11). *Immunosuppression in breast cancer: a closer look at regulatory T cells*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3505617>

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/1887/3505617>

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

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het menselijk immuunsysteem is uitgerust met krachtige mechanismes die bescherming bieden tegen ziekteverwekkers, met het doel schade aan weefsels en organen te voorkomen. Deze mechanismes kunnen ingezet worden als verdediging tegen bedreigingen van buitenaf, zoals pathogene micro-organismen, maar ze bieden ook bescherming tegen een bedreiging die van binnenuit komt: kanker ontwikkeling. Kijkend naar de incidentie van kanker in onze huidige samenleving toont echter aan dat deze bescherming niet waterdicht is. Tumoren kunnen namelijk onder de druk van het immuunsysteem ontkomen. Een belangrijke reden hiervoor is dat kankercellen in essentie geen lichaamsvreemde cellen zijn. Wel hebben kankercellen, als gevolg van continue accumulatie van mutaties, eigenschappen verkregen die ze onderscheidt van gezonde cellen. Kankercellen balanceren daardoor op het randje van lichaamseigen en lichaamsvreemd. Dit bemoeilijkt de herkenning van kankercellen door het immuunsysteem, waarvoor een dreiging duidelijk geïdentificeerd moet kunnen worden als lichaamsvreemd (of immunogeen) om geactiveerd te kunnen raken. Naast dat tumoren slecht herkenbaar zijn, gebruiken ze ook actief andere middelen om immuun-gemedieerde uitroeiing te omzeilen. In het geval van overmatige of misplaatste activering van het immuunsysteem, treden regulatoire mechanismen in werking, die schade aan lichaamseigen weefsels en auto-immuun gerelateerde pathologie voorkomen. Steeds meer bewijs toont echter aan dat tumoren in staat zijn om deze immunoregulerende mechanismen te kapen, en daarmee anti-tumor immuunresponsen tegen primaire en gemetastaseerde kankers kunnen beperken.

Bij kankersoorten zoals borstkanker, kunnen signalen afkomstig van de tumor de infiltratie en ontstekingsremmende polarisatie van myeloïde en adaptieve immuuncellen teweeg brengen. Samen met lokale stromale- en tumorcellen, wordt zo een compact netwerk van immunosuppressie gevormd. Deze intratumorale immunosuppressie wordt gekenmerkt door expressie van immuunremmende receptoren, ontstekingsremmende cytokinen en andere immuunmodulerende factoren die het milieu van de tumor kunnen veranderen in een vijandige omgeving voor effectorcellen. Hiermee worden anti-tumor mechanismen geremd. Bovendien wordt het steeds duidelijker dat deze tumor-geassocieerde immunosuppressie niet beperkt is tot de primaire tumor zelf, maar ook buiten de grenzen van de tumor aanwezig is, wat de verspreiding van kankercellen faciliteert. Door ons begrip van immunoregulerende mechanismen die in borstkanker een rol spelen te vergroten, kunnen bestaande immunotherapieën worden verbeterd om immunosuppressie te omzeilen. Daarnaast kunnen nieuwe inzichten ook de ontwikkeling van nieuwe immunotherapieën stimuleren.

Een belangrijk celtype dat breed betrokken is bij het in goede banen leiden van immuun activatie zijn de regulatoire FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-cellen (T<sub>regs</sub>). T<sub>regs</sub> zijn uitgerust met een divers

arsenaal aan immunosuppressieve mechanismen. Een vermindering in aantal- of functie van  $T_{regs}$  in het lichaam staat aan de basis van een breed scala aan auto-immuunziekten, terwijl  $T_{regs}$  tijdens kanker belangrijke bondgenoten zijn van tumoren, omdat de immunosuppressieve functie van  $T_{regs}$  kan worden gericht tegen anti-tumorimmunitet. Het werk beschreven in dit proefschrift onderzoekt de complexe relatie van  $T_{regs}$  met primaire en gemetastaseerde borstkanker, met behulp van geavanceerde muismodellen die de ontwikkeling en progressie van slecht immunogene tumoren nabootsen. **Hoofdstuk 2** geeft eerst overzicht van de vooruitgang van de afgelopen jaren over ons begrip van  $T_{regs}$  in (menselijke) borstkanker, en bespreekt vanuit welke therapeutische invalshoek  $T_{regs}$  nuttig kunnen zijn.

FOXP3<sup>+</sup>  $T_{regs}$  ontwikkelen zich voornamelijk in de thymus, maar kunnen ook in andere weefsels ontstaan door TGF- $\beta$ -gemedieerde differentiatie van conventionele CD4<sup>+</sup> T-cellen. Deze perifere  $T_{regs}$  (p $T_{regs}$ ) verwerven FOXP3 expressie en immunosuppressieve activiteit, in een proces dat 'perifere conversie' wordt genoemd. Of, en door welke mechanismen, p $T_{regs}$  accumuleren in borsttumoren is echter grotendeels onbekend. Onderzoek in **hoofdstuk 3** toont aan dat de tumor-geassocieerde macrofagen (TAMs), dit zijn de meeste voorkomende immuuncellen in spontane borsttumoren, een sleutelrol spelen in de accumulatie van p $T_{regs}$  in tumoren. Dit wordt gedeeltelijk gemedieerd door TGF- $\beta$  dat wordt afgegeven door TAMs. Daarnaast laten we zien dat TAMs PD-1-expressie induceren op intratumorale conventionele CD4<sup>+</sup> T-cellen, wat als voorbereiding dient op de intratumorale differentiatie in p $T_{regs}$ .

Het lokale milieu van de tumor heeft een belangrijke invloed op het fenotype en de functie van intratumorale immuuncellen. Daarnaast kan de systemische ontsteking die gepaard gaat met tumorontwikkeling en -progressie de functie van immuuncellen tot ver buiten de grenzen van de primaire tumor beïnvloeden. In **hoofdstuk 4** hebben we onderzocht hoe de ontwikkeling van borsttumoren het fenotype, de genexpressie, en de functie van  $T_{regs}$  kan beïnvloeden. Naast tumoren, hebben we dit onderzocht in bloed en organen die vatbaar zijn voor metastase ontwikkeling. Dit toonde aan dat  $T_{regs}$  tijdens de ontwikkeling van borsttumoren systemisch worden geactiveerd, en daarmee nog immunosuppressiever. Daarnaast onthulde RNAseq-analyse dat  $T_{regs}$  in verschillende organen zich op unieke wijze aanpassen aan borsttumor ontwikkeling. Het depletieren van deze tumor-opgeleide  $T_{regs}$  beperkte de uitzaaiing van kankercellen specifiek naar lymfeklieren, maar niet naar longen. Hiermee werd duidelijk dat de rol van  $T_{regs}$  voor metastasevorming per weefsel kan verschillen. Mechanistisch onderzoek toonde aan dat tumor-opgeleide  $T_{regs}$  die zich in de lymfeklieren bevinden de activering van anti-tumor NK cellen kunnen remmen, terwijl  $T_{regs}$  in longen geen functionele invloed uitoefenen op NK cellen. Consistent met onze pre-klinische data ontdekten we dat  $T_{regs}$  toenemen in de schildklier van borstkanker patiënten, terwijl NK cellen afnemen, in vergelijking met lymfeknopen van gezonde personen. Deze studie laat zien dat  $T_{regs}$  een belangrijke rol spelen bij de ontwikkeling van lymfekliermetastase bij



borstkanker, en onthult dat neoadjuvante targeting van  $T_{regs}$  bij borstkanker therapeutisch voordeel kan hebben. Het belang van immuunregulatie voor de uitzaaiing van kanker naar verschillende organen wordt verder benadrukt in **hoofdstuk 5**. Hier wordt beschreven dat borstkankercellen Cathepsine C aanmaken. Dit veroorzaakt de accumulatie van neutrofielen in de longen van tumor-dragende muizen, wat lokaal de vorming van metastasen bevordert. Therapeutische strategieën die gericht zijn op het activeren van T-cellen tegen kanker, zoals immuuncheckpoint blokkade (ICB), revolutioneren de behandeling van kanker. Omdat  $T_{regs}$  immuuncheckpoint-moleculen in hoge mate tot expressie kunnen brengen, is het ook belangrijk om te begrijpen hoe ICB  $T_{regs}$  beïnvloed. Dit is de focus van **hoofdstuk 6**. Omdat spontane tumoren van het KEP model niet reageren op de combinatie van anti-PD1/anti-CTLA4, is het mogelijk dit model te gebruiken om onderzoeken hoe resistentie tegen ICB ontstaat. We ontdekten dat muizen behandeld met ICB worden gekenmerkt door expansie van immunosuppressieve  $T_{regs}$  in bloed en tumoren, terwijl effector-T-cellen onveranderd blijven. Depletie van  $T_{regs}$  tijdens ICB induceert inflammatie in tumoren, en ontketent de accumulatie van geactiveerde  $CD8^+$  T-cellen en NK-cellen in het bloed. Bovendien verlengt de depletie van  $T_{regs}$  tijdens ICB de overleving van muizen met metastase ontwikkeling, wat aantoont dat  $T_{regs}$  een hindernis vormen voor een gewenste reactie op ICB.

Naast fenotypische karakterisering, zijn functionele testen nuttig om te bestuderen hoe kanker, weefselcontext of therapieën het immunosuppressieve karakter van  $T_{regs}$  beïnvloeden. **Hoofdstuk 7** beschrijft een experimenteel protocol dat in het proefschrift is gebruikt. Dit protocol maakt het mogelijk om kwantitatief en reproduceerbaar de functie van tumor-geassocieerde  $T_{regs}$  te beoordelen.

Ten slotte worden in **hoofdstuk 8** de inzichten uit dit proefschrift in een breder perspectief besproken en geef ik mijn gedachten over hoe we ons fundamentele begrip van  $T_{reg}$ -biologie bij kanker nog verder kunnen vergroten. Uiteindelijk kan dit bijdragen aan de ontwikkeling van therapeutische toepassingen die gericht zijn op het omzeilen van immuunregulerende mechanismen bij borstkanker.

