



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Everyone works better together: rational improvements to radio- and immunotherapy combinations

Frijlink, E.S.

### Citation

Frijlink, E. S. (2024, April 4). *Everyone works better together: rational improvements to radio- and immunotherapy combinations*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3731335>

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/1887/3731335>

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

## Nederlandse Samenvatting

In dit proefschrift beschrijf ik hoe T-cellen kunnen bijdragen aan het opruimen van kankercellen, vooral na radiotherapie (RT), en hoe immunotherapie (IT) hierbij kan helpen. Tegenwoordig zijn infectieziekten veelal effectief te voorkomen of bestrijden en daarom zijn kanker en hart- en vaatziekten, nu de belangrijkste gezondheidsproblemen. Kanker wordt vaak beschouwd als een enkele ziekte, maar eigenlijk is het een begrip dat verschillende ziekten omvat die worden bepaald door het weefsel van oorsprong, de onderliggende genetische veranderingen en de aanwezigheid van niet-tumorcellen, waaronder immuuncellen. Tijdens de ontwikkeling en behandeling van tumoren zijn deze cellen voortdurend in gesprek met elkaar, wat leidt tot evoluerende cellulaire ecosystemen.

Kankers worden in de eerste plaats behandeld door chirurgie, maar als de kanker (mogelijk) is uitgezaaid, of moeilijk te verwijderen door een operatie worden RT en chemotherapie toegepast. Deze conventionele therapieën zijn geselecteerd en ontworpen om snel delende tumorcellen te doden. RT is een lokale behandeling die tot doel heeft tumormassa's te verminderen zonder het omliggende gezonde weefsel te schaden. Daarom heeft RT over het algemeen minder ernstige bijwerkingen dan chemotherapie, die door het hele lichaam wordt toegediend om systemische kankerverspreiding te bestrijden. Kankercellen kunnen echter van origine resistent zijn tegen RT, of dit worden in de loop van de behandeling.

Oorspronkelijk werd gedacht dat RT alleen werkt door de celdeling van tumorcellen te stoppen en celdood teweeg te brengen door DNA-schade. Recent is duidelijk geworden dat RT ook T-cellen activeert die bijdragen aan het therapeutisch effect. Ook andere immuuncellen in de tumor reageren op RT. CD8<sup>+</sup> en CD4<sup>+</sup> T-cellen zijn ontstaan in de evolutie om ons te beschermen tegen infectie door virussen en andere micro-organismen. Ziekteverwekkers die ons lichaam binnendringen, kunnen worden herkend door T cellen. CD8<sup>+</sup> T-cellen vermeerderen zich na deze herkenning en veranderen in celdodende T-lymfocyten (CTLs), die heel effectief geïnfecteerde cellen kunnen doden. CD8<sup>+</sup> T-cellen kunnen ook reageren op tumorcellen als daar lichaamsvreemde moleculen in zitten. In alle gevallen worden T cellen geactiveerd om te delen en CTLs te worden in lymfeklieren die nabij het geïnfecteerde weefsel of de tumor liggen. Dendritische cellen (cDCs) die in de weefsels zitten, nemen resten van dode cellen in zich op en brengen deze naar de lymfeklieren. Ze verteren de celresten en presenteren de vreemde moleculen in kleine stukjes (peptiden) aan T cellen. Die peptiden heten antigenen. Nadat CTLs op deze manier zijn geactiveerd, verlaten ze de lymfeklier en gaan ze via het bloed naar het geïnfecteerde (of tumor) weefsel waar ze hun doelwitcellen doodmaken. CD4<sup>+</sup> T-cellen zijn cruciaal om hulp te bieden voor effectieve CTL- en antilichaamreacties.

Aangezien tumoren afkomstig zijn van lichaamseigen cellen, worden ze niet gemakkelijk herkend als "vreemd" en roepen ze meestal geen T-celreactie op. RT-geïnduceerde schade en dood

van tumorcellen kunnen helpen om een T-celreactie op te wekken. Er komen na RT namelijk ontstekingsmoleculen en vreemde moleculen vrij die cDCs activeren en tumor-specifieke T-celreacties teweeg kunnen brengen. Tumoren stellen zich teweeg tegen aanvallen van T cellen door deze op diverse manieren te onderdrukken via andere immuuncellen, zowel lokaal in de tumor, alsook in de lymfeklieren en zelfs door het hele lichaam heen. Deze processen kunnen T-celreacties remmen, maar ook de uitzaaiing van kanker vergemakkelijken. Een belangrijk celtype dat de CTL-reactie onderdrukt is de regulatoire T cel (Treg). Deze Tregs gebruiken meerdere mechanismen om T-celactiviteit te onderdrukken, direct of indirect (bijvoorbeeld via cDCs). Daarom spelen ze een essentiële rol bij het voorkomen van overmatige en zelf-reactieve immuniteit.

Om het therapeutisch effect van RT te verbeteren, worden klinische studies vaak gecombineerd met IT. Hierbij wordt vooral gebruik gemaakt van zogenoemde antilichaam-gebaseerde immuuncheckpointblokkade (ICB) tegen receptoren die zich op T cellen bevinden en hun functie belemmeren, zoals PD-1 of CTLA-4. ICB heeft tot doel T-celreacties tegen tumoren te versterken door ofwel immuunremmende receptoren te blokkeren of immuunstimulerende moleculen te activeren. De gecombineerde benadering van RT en IT heeft het potentieel om de effectiviteit van lokale RT te verbeteren en tegelijkertijd systemische T-celreacties tegen tumoren op te wekken, wat cruciaal is om uitzaaiing van tumorcellen te remmen. Het is moeilijk om succesvolle combinaties van RT en ICB in de klinische praktijk toe te passen, vooral omdat we nog niet goed begrijpen hoe de T cel respons op RT wordt opgewekt en hoe dit verloopt in de verschillende kankertypen. We willen daarom beter begrijpen welke factoren nodig zijn om RT-geïnduceerde T-celreacties te initiëren en te ondersteunen. Zo kunnen we op basis van het verkregen inzicht meer rationeel behandelingsstrategieën ontwerpen, die dan effectief lokale of systemische immuunonderdrukking kunnen overwinnen. Dit proefschrift draagt bij aan een dieper begrip van hoe RT de T-cel respons beïnvloedt en biedt richtlijnen voor het rationaliseren van RT/IT combinaties.

In **hoofdstuk 2** hebben we openbaar beschikbare gegevens van The Cancer Genome Atlas (TCGA) gebruikt om de invloed van RT op de overleving kankerpatiënten te onderzoeken. We ontdekten dat RT minder effectief is bij patiënten met kankers die gekenmerkt worden door weinig T cellen en veel myeloïde cellen. Om dit fenomeen beter te begrijpen, maakten we gebruik van tumorcellen die we in muizen implanteren. Voor een bepaald tumormodel (TC-1) stelden we vast dat het lijkt op de tumoren in de mens, waar veel Tregs en myeloïde cellen inzitten en die slecht op RT reageren. Dit model zijn we daarom gaan bestuderen. We ontdekten dat TC-1-tumoren tijdens hun ontwikkeling een Treg respons opwekken door het hele lichaam heen en dat die Treg cellen dus ook verhoogd aanwezig zijn in de tumor en de drainerende lymfeklier. In die lymfeklier moet de CTL-respons worden opgewekt. Het bleek dat RT van de TC-1 tumor wel een CTL-respons in de lymfeklier opwekt, maar tegelijkertijd ook een Treg respons, die de tumorafstoting door CTLs verhindert. We hadden verwacht dat blokkade van CTLA-4 of PD-1 de CTL-respons zou

verbeteren, maar het verbeterde juist de Treg-respons. Dit is een belangrijke observatie, omdat vergelijkbare effecten zich mogelijk ook voordoen bij menselijke tumoren van dit type. Tijdens de ontwikkeling van TC-1-tumoren ontstaat een Treg-respons in het hele lichaam, wat leidt tot verhoogde aanwezigheid van Treg-cellen in de tumor en de drainerende lymfeklier. We ontdekten dat deze Treg respons wordt gedreven door de costimulerende receptor CD28 op de Treg-cellen. CD28 is ook essentieel voor het op gang brengen van CTL-responsen. We vroegen ons daarom af hoe bepaald wordt of de CTL of de Treg profiteren van CD28 costimulatie, vooral wanneer er veel Treg-cellen aanwezig zijn in de lymfeklier. Dit hebben wij opgelost door de bijdrage van CD80 en CD86 te onderzoeken. Deze moleculen zijn de bindingspartners van CD28 en bepalen of CD28 wordt geactiveerd. Deze zogenaamde liganden zitten op cDC. We vonden door selectief CD86 or CD80 te blokkeren in combinatie met RT, dat de Treg-respons specifiek werd gedreven door CD86. Door CD86 te blokkeren konden we de CTL-respons verbeteren, dankzij onderdrukking van de Treg respons. Onder deze omstandigheden verbeterde PD-1 blokkade tumorbestrijding en overleving. We laten met deze studie zien dat ook in tumortypen die een sterke Treg respons opwekken, RT een CTL-respons kan opwekken, die effectief de tumor kan bestrijden als je de Treg respons remt. Dit lukt dan niet met de standaard ICB benaderingen, zoals PD-1 of CTLA-4 blokkade, die het tegengestelde resultaat hebben, maar wel met CD86 blokkade. We denken dat onze ontdekking dat CD86 specifiek Treg responsen drijft tot nieuwe strategieën kan leiden.

De rol van Tregs in het onderdrukken van de immuunrespons tegen tumoren heeft de laatste jaren veel aandacht gekregen. Toch begrijpen we nog niet volledig hoe tumoren zorgen voor de activatie van Tregs in de lymfeklieren. Er zijn twee manieren waarop Tregs kunnen ontstaan: in de thymus (tTregs), waar ze uitrijpen in respons op lichaamseigen antigenen en dan naar de lymfeklieren migreren om hun functies uit te oefenen en zich verder te ontwikkelen. Of ze kunnen ontstaan doordat volwassen CD4<sup>+</sup> T-cellen veranderen in Tregs die reageren op niet-lichaamseigen antigenen.

In **hoofdstuk 3** karakteriseren we de respons van Tregs in de lymfeklieren en de tumor tijdens de ontwikkeling van TC-1 tumoren. Het blijkt dat dit type tumor de groei en differentiatie van tTregs in de lymfeklieren bevordert, wat resulteert in een grotere aanwezigheid van deze cellen in de tumor, waar ze een meer volwassen fenotype aannemen. We stellen experimenten voor om beter te begrijpen hoe tumoren deze Tregs activeren in de lymfeklieren en hoe Treg ontwikkeling in de tumoren zich onderscheidt van gezonde weefsels. We leggen in dit hoofdstuk uit dat we Treg responsen opgewekt door tumoren willen remmen, maar niet alle Tregs willen verwijderen tijdens de kankerbestrijding, want dan krijgt de patient ongewenste immuunbijwerkingen.

**Hoofdstuk 4** beschrijft hoe RT gecombineerd kan worden met immunotherapie (ICB) om CTL-responsen tegen kanker op te wekken, die in het hele lichaam effect kunnen hebben, dus ook kunnen werken in geval van uitgezaaide kanker. In dit geval hebben we voor ICB zowel de

remmende receptor PD-1 geblokkeerd en de costimulerende receptor CD137 geactiveerd met behulp van antistoffen. In een muismodel van lokale borstkanker bevorderde deze combinatie behandeling CTL-responsen tegen de tumor. Toen we een tweede tumor in dezelfde muis lieten groeien, zagen we dat RT in combinatie met deze ICB de afstoting van de bestraalde tumor verbeterde, maar niet de afstoting van deze tweede, niet-bestraalde tumor. We vonden dat CTLs die door de gecombineerd behandeling werden opgewekt, beter tumorcellen konden doodmaken in de bestraalde dan in de onbestraalde tumor. Om een vergelijkbaar effect te bereiken in de niet-bestraalde tumor hebben we lage dosis chemotherapie, in de vorm van cisplatine, toegepast. Dit stimuleerde de activiteit van CTLs in de niet-bestraalde tumor en resulteerde in een verbeterde algehele overleving. Dit hoofdstuk benadrukt dat in situaties waarin CTL-activering kan worden bereikt door ICB-behandeling alleen, conventionele behandelingen zoals RT en lage dosis chemotherapie nuttig kunnen zijn om lokale immuun onderdrukking in de tumor te overwinnen, mits ze strategisch worden ingezet op basis van begrip van de werkingsmechanismen.

In **hoofdstuk 5** ontdekken we een nieuwe rol van een molecuul genaamd autotaxine (ATX) bij het afweren van CTLs uit tumoren. We hebben vastgesteld dat ATX, dat wordt uitgescheiden door zowel tumorcellen als andere cellen, T-cel migratie naar de tumor voornamelijk belemmert door te binden aan een receptor, genaamd LPAR6. Om dit te onderzoeken, hebben we tumorcellen gemanipuleerd zodat ze extra ATX produceerden en deze cellen bij muizen geïmplantteerd. Zo konden we vaststellen dat ATX geproduceerd door de tumor geen invloed had op het opwekken van een CTL-respons door middel van vaccinatie, maar wel verhinderde dat deze CTLs de tumor binnendrongen, wat resulteerde in een aanzienlijk lagere overlevingskans voor de muizen. Er zijn al chemische remmers van ATX in ontwikkeling voor klinisch gebruik, met het idee dat deze uitzaaiing van tumorcellen kunnen remmen. Onze bevindingen voegen nu toe dat het mes aan twee kanten snijdt, want de remmers kunnen er ook voor zorgen dat de CTL-respons tegen de kanker wordt versterkt. Samen met onze bevindingen in **hoofdstuk 4**, benadrukt deze studie dat behandelingen die gericht zijn op het stimuleren van CTL-activiteit, zoals conventionele ICB, mogelijk niet succesvol zullen zijn, tenzij we een diepgaand begrip hebben van de specifieke CTL-remmende mechanismen, en deze op een gerichte manier tegengaan.

Tenslotte bespreek ik in **hoofdstuk 6** de bevindingen die in dit proefschrift beschreven zijn en bied ik context binnen de huidige wetenschappelijke literatuur. Bovendien verken ik hoe in de toekomst RT waardevol kan zijn bij het verbeteren van de immuunrespons tegen tumoren, met name binnen de diverse landschappen van menselijke tumoren. Samen dragen deze bevindingen bij aan een rationele toepassing van RT om effectieve immuunreacties tegen verschillende soorten kanker mogelijk te maken.