



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Immune cell networks in Inflammatory Bowel Disease: towards novel therapeutic approaches

Ouboter, L.F.

Citation

Ouboter, L. F. (2025, May 27). *Immune cell networks in Inflammatory Bowel Disease: towards novel therapeutic approaches*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4247235>

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/1887/4247235>

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

Nederlandse samenvatting

Inflammatoire darmziekte: een complexe en heterogene ziekte

Inflammatoire darmziekten (IBD) is een overkoepelende naam van chronische ziekten met ontstekingen in de darm. In Nederland heeft 1 op de 200 mensen IBD. De twee bekendste vormen zijn de ziekte van Crohn en colitis ulcerosa. Bij de ziekte van Crohn is er sprake van ontsteking die door de hele darmwand heen gaat (transmuraal) en die in het gehele darmsysteem, van mond tot anus, voor kan komen. Colitis ulcerosa daarentegen is beperkt tot de dikke darm en tast alleen de binnenste slijmvlieslaag (mucosa) aan. De eerste symptomen ontstaan meestal tussen het 20e en 40e levensjaar, maar ook kinderen en ouderen kunnen voor het eerst met de ziekte geconfronteerd worden. De symptomen die optreden verschillen per persoon en kunnen in de loop van de ziekte veranderen. Veelvoorkomende klachten zijn terugkerende buikpijn, diarree, bloed in de ontlasting, vermoeidheid en gewichtsverlies. Daarnaast kan de ziekte van Crohn gecompliceerd worden door de vorming van vernauwingen (stricturen), abcessen of fistels. Perianale fistels, een abnormale verbinding tussen de darm en de huid rond de anus, zijn een ernstige en invaliderende complicatie van de ziekte van Crohn. Bij colitis ulcerosa zijn de meest zorgwekkende complicaties de noodzaak tot het verwijderen van de dikke darm (colectomie) en een verhoogd risico op darmkanker. Daarnaast kunnen bij beide ziektebeelden ook klachten buiten de darm optreden, bijvoorbeeld ontsteking van de gewrichten, huid, en galwegen. De diagnose van IBD wordt gesteld op basis van een combinatie van klinisch onderzoek, bloed- en ontlastingsonderzoek, endoscopie (darmonderzoek), beeldvormend onderzoek en weefselonderzoek. Een darmonderzoek van de dikke darm en het laatste stukje van de dunne darm met het nemen van hapjes wordt beschouwd als de gouden standaard voor het stellen van de diagnose.

De precieze oorzaak van IBD is nog onbekend, maar we weten dat een verstoorde immuunreactie tegen darmbacteriën een grote rol speelt, in combinatie met erfelijke- en omgevingsfactoren.

De huidige behandeling van IBD

De huidige behandeling van IBD bestaat meestal uit levenslange therapieën die de functies van het immuunsysteem onderdrukken of blokkeren. Er wordt gebruik gemaakt van onder andere prednison en thiopurines, maar ook van selectievere blokkers van het immuunsysteem, zoals anti-TNF- α , anti- $\alpha 4\beta 7$ -integrin, anti-p40 therapie of JAK remmers. Echter, bij een aanzienlijk aantal patiënten blijven de klachten door aanhoudende ontsteking bestaan, neemt de effectiviteit na verloop van tijd af, of treden er bijwerkingen op. Deze verschillen in behandelrespons kunnen mogelijk verklaard worden door variaties in onderliggende biologische processen van de ziekte. Op dit moment worden patiënten met IBD behandeld volgens een “one-size-fits-all” – benadering. Door het immuunsysteem op celniveau beter in kaart te brengen, kunnen patiënten beter worden geclassificeerd, wat kan bijdragen aan de ontwikkeling van meer gepersonaliseerde behandelstrategieën.

Immuunsysteem

Ons immuunsysteem bestaat uit een grote verzameling van witte bloedcellen met diverse functies. Deze cellen kunnen grofweg worden ingedeeld in het aangeboren- en verworven, ook wel adaptieve, immuunsysteem. Het aangeboren immuunsysteem kan snel reageren tegen ziekteverwekkers (pathogenen). Myeloïde cellen, zoals dendritische cellen, macrofagen en monocytën, spelen hierin een belangrijke rol. Zij kunnen lichaamseigen- of lichaamsvreemde eiwitten (antigenen) opnemen en presenteren aan het verworven immuunsysteem. Omdat deze cellen antigenen presenteren, worden ze antigeen-presenterende cellen genoemd. Dit proces activeert een gerichte immunreactie. Het verworven immuunsysteem bestaat onder andere uit B-lymfocyten en T-lymfocyten, zoals helper CD4⁺ T cellen en cytotoxische CD8⁺ T cellen. Deze cellen werken met specifieke antigeenreceptoren en immuunglobulines, waardoor ze doelgericht antigenen kunnen herkennen en een specifieke immunreactie op gang kunnen brengen. Hoewel deze reactie meer tijd kost dan die van het aangeboren immuunsysteem, biedt het verworven immuunsysteem geheugen. Hierdoor kan het bij herhaalde blootstelling aan hetzelfde antigeen sneller en effectiever reageren. Immuuncellen kunnen worden onderscheiden op basis van de eiwitten aan hun celoppervlak. Deze eiwitten bepalen aan welke andere cellen ze kunnen binden, communiceren of welke ze kunnen uitschakelen. Door deze eiwitten te analyseren, kunnen de verschillende immuuncellen nauwkeurig worden gekarakteriseerd.

Geavanceerde analysetechnieken: massa cytometrie en spectrale flow-cytometrie

In dit proefschrift hebben we geavanceerde analysetechnieken toegepast, waaronder 'single-cell mass cytometrie', 'imaging-mass cytometrie' en 'spectrale flowcytometrie'. Deze technieken zijn gebruikt om darmweefsel, fistelschraapsel en bloedmonsters van zowel patiënten met IBD als controlepersonen te analyseren, met als doel een beter inzicht te krijgen in de immunologische processen die bij deze ziekte een rol spelen. Voorheen werd flowcytometrie gebruikt om immuuncellen te identificeren, maar deze methode kon maximaal 12 markers (eiwitten) tegelijk meten. De introductie van massa cytometrie en later spectrale flowcytometrie maakte het mogelijk meer dan 40 immuuncelmarkers tegelijkertijd te analyseren. Dit heeft geleid tot diepgaandere celanalyses, waardoor we de heterogeniteit binnen IBD beter kunnen ontrafelen.

In **Hoofdstuk 2** hebben we single-cell massa cytometrie gebruikt om de betrokken immuuncellen in onbehandelde (naïeve) patiënten met IBD in kaart te brengen. Een ziekte-geassocieerd netwerk van intestinale immuuncellen, waaronder HLA-DR⁺CD38⁺ CD4⁺ T-geheugencellen, T-regulatorische cellen, PD1⁺ CD8⁺ T-geheugencellen, neutrofielen, CD27⁺ TCRγδ cellen en NK cellen, werd geïdentificeerd in een subset van patiënten met IBD. De aanwezigheid van dit netwerk was onafhankelijk van het IBD-subtype, de ernst of de locatie in de darm. Met name werd een subset van HLA-DR⁺ CD4⁺ T-geheugencellen, die leek op de IBD-geassocieerde HLA-DR⁺ CD4⁺ T-cellen in de darm, geïdentificeerd in perifere bloed. Deze cellen kwamen aanzienlijk vaker voor bij patiënten met IBD dan bij controlepersonen. Daarnaast pasten we imaging massa-cytometrie (IMC) toe om de weefselarchitectuur en de ruimtelijke locatie van ontstekingsgeassocieerde immuuncellen in weefsel te bestuderen. In darmweefsel van patiënten met IBD zagen we een dicht netwerk van CD4⁺ T-geheugencellen, CD66b⁺ neutrofielen en verschillende antigeen-presenterende cellen, waaronder conventionele dendritische cellen en weefselmacrofagen, gelokaliseerd net onder de darmepitheellaag. Deze celaggregaten waren daarentegen afwezig in darmweefsel van controlepersonen.

Mesenchymale stromale cel therapie voor de behandeling van refractaire proctitis ulcerosa

Het primaire doel van de behandeling van IBD is het bereiken van genezing van het darmslijmvlies, waardoor ziekteprogressie wordt voorkomen en de kwaliteit van leven wordt verbeterd. Een deel van de patiënten met proctitis ulcerosa, waarbij er alleen ontsteking is van het rectum, kan effectief alleen met lokale therapie worden behandeld. Er is echter een groep patiënten voor wie lokale therapie onvoldoende is en die een andere behandelstrategie nodig hebben. Voor patiënten die refractair zijn voor

eerstelijns lokale therapie, is er een dringende behoefte om nieuwe lokale therapieën te onderzoeken die de ziekte effectief behandelen, maar waarbij systemische bijwerkingen niet optreden. Mesenchymale stromale cellen (MSCs) zijn een voorbeeld van een nieuwe behandeling voor IBD vanwege hun afweer-onderdrukkende en weefselherstellende eigenschappen. Lokaal toegediende MSCs zijn effectief gebleken bij de behandeling van refractaire perianale fistels bij de ziekte van Crohn. Bovendien toonde onze afdeling eerder aan dat endoscopisch geïnjecteerde MSCs in staat waren om experimentele colitis bij muizen te verlichten.

In **Hoofdstuk 3** onderzochten we lokaal geïnjecteerde allogene (van donor afkomstig) beenmerg (bm)-verkreten MSCs als therapie voor proctitis ulcerosa. In deze klinische studie kregen dertien patiënten met proctitis ulcerosa, die refractair waren voor zowel rectale 5-aminosalicylzuur (ASA) als rectale corticosteroïden, lokale injecties van allogene bm-MSCs. De behandeling bleek veilig, haalbaar en goed verdraagbaar voor deze patiëntengroep. Bovendien vertoonde de lokale MSC-therapie veelbelovende tekenen van klinische effectiviteit en zou therapeutische voordelen kunnen bieden voor patiënten met refractaire proctitis ulcerosa. Opmerkelijk was dat significante veranderingen in de samenstelling van de weefselresidente immuuncellen werden waargenomen na toediening van MSCs. Deze bevindingen vormen de basis voor een grotere, dubbelblinde, placebogecontroleerde klinische studie om de lokale MSC-therapie verder te onderzoeken als een potentiële behandeling voor IBD en om de immuunregulatorische effecten op slijmvliesniveau nauwkeuriger te karakteriseren.

Perianale fistels: onderscheid op basis van immuuncelfenotype en microbiota

Perianale fistels, een pathologische verbinding tussen het darmlumen en de huid rondom de anus, zijn een invaliderende complicatie van de ziekte van Crohn, zoals ook hierboven besproken. De meerderheid, meer dan 90%, van alle perianale fistels is echter niet gerelateerd aan IBD en ontstaat meestal uit geïnfecteerde anaalklieren en uit perianale abcessen, en wordt daarom cryptoglandulair genoemd. In de klinische praktijk zijn ziekte van Crohn-geassocieerde en cryptoglandulaire fistels macroscopisch vaak moeilijk te onderscheiden. Ze worden meestal onderscheiden door de aanwezigheid van ontsteking van de darmmucosa bij de ziekte van Crohn. Bij 30% van de patiënten met de ziekte van Crohn vormen fistels echter de eerste manifestatie, jaren voordat ontsteking van de darm optreedt, waardoor differentiatie een grote uitdaging kan zijn. Gezien de grote verschillen in complexiteit, behandelingsmogelijkheden en genezingspercentages is een nauwkeurig onderscheid tussen deze fisteltypen cruciaal voor optimale behandeling.

In **Hoofdstuk 4** bespreken we de verschillen in epidemiologie, pathogenese en klinische behandeling tussen ziekte van Crohn-geassocieerde en cryptoglandulaire perianale fistels. Daarnaast geven we een stroomschema om artsen te helpen bij de behandeling van patiënten met een eerste episode van perianale fistels.

Om onderscheid te maken tussen de ziekte van Crohn-geassocieerde en cryptoglandulaire perianale fistels bij afwezigheid van ontsteking van de darm en om effectievere therapieën te ontwikkelen, onderzochten we verschillen in immuuncellen (**Hoofdstuk 5**) en microbiële samenstelling (**Hoofdstuk 6**) in deze twee fisteltypen. Single-cell massa cytometrie gecombineerd met spectrale flow-cytometrie toonde aan dat geactiveerde HLA-DR⁺CD38⁺ effector CD4⁺ T-cellen met een Th1/17 fenotype significant verrijkt waren in ziekte van Crohn-geassocieerde fistels vergeleken met cryptoglandulaire fistels, en een veelbelovende biomarker in het bloed zijn om onderscheid te maken tussen deze twee typen fistels (**Hoofdstuk 5**). We identificeerden dit fenotype ook in associatie met darmontsteking in een subset van IBD-patiënten (**Hoofdstuk 3**). De aanwezigheid van dit fenotype in vrijwel alle ziekte van Crohn-geassocieerde fistels kan duiden op een verband met een agressiever ziektebeloop bij de ziekte van Crohn. In **Hoofdstuk 5** werd imaging massa cytometrie gebruikt om de ruimtelijke locatie van HLA-DR⁺CD4⁺ T-cellen te bestuderen. Hieruit bleek dat HLA-DR⁺CD38⁺CD4⁺ T-cellen zich in de buurt van B-cellen bevinden en mogelijk een rol spelen bij het bieden van hulp aan B-cellen. Gericht aangrijpen van HLA-DR en CD38 op CD4⁺ T-cellen kan een potentiële nieuwe therapeutische strategie zijn voor ziekte van Crohn-gerelateerde fistels.

In een pilotstudie, beschreven in **Hoofdstuk 6**, hebben we de microbiële samenstelling van ziekte van Crohn-geassocieerde en cryptoglandulaire perianale fistels gekarakteriseerd. We vonden onder andere een hogere relatieve aanwezigheid aan Fusobacteriaceae en *R. gnavus* in ziekte van Crohn-geassocieerde fistels vergeleken met cryptoglandulaire fistels. Terwijl *[Eubacterium]_coprostanoligenes_groep*, *Holdemanella* en *Subdoligranulum* relatief meer aanwezig waren in cryptoglandulaire fistels. In de toekomst zouden waargenomen verschillen in de fistelmicrobiota kunnen helpen bij het identificeren van nieuwe biomarkers om beide fisteltypen van elkaar te onderscheiden.

Conclusie en toekomstperspectief

Dit proefschrift laat zien dat geavanceerde analysetechnieken, zoals massa cytometrie en spectrale flowcytometrie, gebruikt kunnen worden om de heterogene cellulaire netwerken te karakteriseren die geassocieerd zijn met ontsteking in IBD.

HLA-DR⁺CD38⁺ CD4⁺ T-helpercellen worden geïdentificeerd als onderdeel van een cellulair netwerk in zowel behandeling-naïeve patiënten met IBD als ziekte van Crohn-geassocieerde perianale fistels, wat suggereert dat dit fenotype kan dienen als potentieel doelwit voor toekomstige therapeutische strategieën. Verder onderzoek zou zich moeten richten op het analyseren van cellulaire interacties binnen dit netwerk en het onderzoeken van de antigeenspecificiteit van deze cellen en hun rol in B-cel hulp, wat nieuwe therapeutische doelwitten zou kunnen opleveren. Om de klinische relevantie te verbeteren, moeten toekomstige studies dit netwerk van immuuncellen correleren met een groot goed gedefinieerd cohort van patiënten, waardoor een betere stratificatie van de patiënt en gepersonaliseerde behandelingen mogelijk worden.