



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Systemic immune dynamics in cancer

Bakker, E.A.M.

Citation

Bakker, E. A. M. (2026, January 9). *Systemic immune dynamics in cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4286248>

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/1887/4286248>

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

Nederlandse samenvatting

Kanker vormt wereldwijd een groot probleem voor de volksgezondheid, met een levenslange kans van ongeveer één op de vijf mensen om de ziekte te ontwikkelen. In Nederland ligt de incidentie zelfs hoger: één op de twee mensen krijgt ooit kanker. Ongeveer één op de negen mannen, en één op de twaalf vrouwen overlijdt aan kanker. Van alle kankersoorten komt borstkanker het meest voor bij vrouwen wereldwijd en in Nederland. Borstkanker is ook de belangrijkste oorzaak van kanker gerelateerde sterfte onder vrouwen. Dit benadrukt de noodzaak om ons begrip van de biologie van borstkanker te verdiepen en effectievere behandelingsstrategieën te ontwikkelen.

In de afgelopen decennia is gebleken dat immuuntherapie een baanbrekende behandelingsmethode kan zijn. Immuuncheckpointremmers gericht tegen CTLA-4 en PD-(L)1 hebben indrukwekkende resultaten laten zien bij onder andere melanoom, longkanker en niercelcarcinoom. Borstkanker werd traditioneel beschouwd als weinig gevoelig voor immuuntherapie vanwege het lage aantal mutaties en de beperkte infiltratie van immuuncellen in de tumor. Inmiddels is duidelijk geworden dat borstkanker immunologisch heterogeen is en dat het aantal tumor infiltrerende lymfocyten (TILs) erg kan verschillen tussen mensen. Deze diversiteit opent nieuwe mogelijkheden voor immuuntherapie, in het bijzonder bij bepaalde subtypes en stadia van de ziekte.

Eén bepaalde immuuncel, de neutrofiel, speelt een centrale rol in door tumoren geïnduceerde systemische ontsteking. Neutrofielen worden steeds meer erkend als belangrijke actoren in zowel het ontstaan, als de progressie van kanker. Een essentiële eigenschap van neutrofielen is hun migratievermogen, waarmee zij vanuit de bloedbaan weefsels, waaronder tumoren, kunnen binnendringen om daar effectorfuncties uit te voeren. In **hoofdstuk 2** wordt een uitgebreid protocol beschreven om *ex vivo* migratie van vers geïsoleerde humane neutrofielen te meten, wat waardevolle inzichten biedt in hun gedrag.

Om het effect van het stadium en het subtype van borst kanker op het systemische immuunlandschap te bestuderen, werd een uitgebreide immuunprofielering uitgevoerd met multiparameter flowcytometrie op vers verzamelde bloedmonsters van een grote groep patiënten met verschillende subtypes en ziektestadia, en vergeleken met het immuunprofiel van gezonde donoren (HDs). Het gebruik van verse monsters maakte analyse van kortlevende granulocyten, zoals neutrofielen en eosinofielen mogelijk; cellen die vrijwel geheel verloren gaan in ingevroren materiaal. De resultaten beschreven in **hoofdstuk 3** laten zien dat patiënten met vroeg-stadium borstkanker verhoogde niveaus van neutrofielen, klassieke monocyt en CD1c⁺ dendritische cellen (DCs) vertonen ten opzichte van HDs. Bij gemetastaseerde ziekte bleven neutrofielen en klassieke monocyt verhoogd, en waren ook niet-klassieke monocyt toegenomen. Tegelijkertijd waren geheugen B-cellen,

plasmablasten, conventionele CD4⁺ T-cellen en Tregs verlaagd bij deze patiënten, wat wijst op toenemende immuundisregulatie naarmate de ziekte vordert. Verdere uitsplitsing per borstkanker subtype toonde subtype-specifieke verschillen aan: bij vroeg-stadium HR⁺ borstkanker waren neutrofielen, klassieke monocyt en CD1c⁺ DCs verhoogd terwijl HER2⁺ tumoren geen significante afwijkingen ten opzichte van HDs vertoonden. Het systemische immuun profiel van patiënten met niet-gemetastaseerde TNBC werd gekenmerkt door verhoogde niet-klassieke monocyt en Vδ2 γδ T-cellen. In de gemetastaseerde setting was HR⁺ ziekte geassocieerd met verhoogde neutrofielen en niet-klassieke monocyt en verlaagde Tregs. HER2⁺ ziekte toonde verlaging van plasmablasten, conventionele CD4⁺ T-cellen en Tregs. De meest uitgesproken afwijkingen werden gezien bij gemetastaseerd TNBC, met verhoogde neutrofielen en klassieke monocyt en verlaagde niveaus van diverse adaptieve immuuncellen.

In **hoofdstuk 4** werd dieper ingegaan op TNBC. Het bleek dat patiënten met mTNBC niet alleen meer neutrofielen hadden dan HDs, maar dat deze neutrofielen ook functioneel en transcriptieel anders waren. Experimenten die het transcriptoom, het proteoom en de functionaliteit in kaart brachten, toonden aan dat neutrofielen van patiënten met mTNBC een verhoogd migratievermogen, hogere expressie van granulaire eiwitten en verhoogde productie van reactieve zuurstofsoorten (ROS) vertoonden. De gegevens uit **hoofdstukken 3 en 4** tonen aan dat immuun disregulatie bij borstkanker wordt beïnvloed door zowel subtype als ziektestadium, met de meest uitgesproken veranderingen bij TNBC. Deze bevindingen bieden aanknopingspunten voor het ontwikkelen van therapieën die de systemische verstoringen van het immuun systeem als gevolg van de kanker tegengaan, en onderstrepen het belang van subtype- en stadiumspecifieke benaderingen.

In **hoofdstuk 5** onderzochten we de verschillen in transcriptionele activiteit van circulerende immuun cellen van patiënten met mTNBC en HDs met behulp van single-cell RNA-sequencing van vers volbloed, aangevuld met matchende TCR- en BCR-sequencing om de klonaliteit en diversiteit van lymfocyten te beoordelen. We hebben meerdere transcriptiestaten binnen neutrofielen geïdentificeerd, wat wijst op een grotere heterogeniteit binnen dit celtype dan traditioneel wordt aangenomen. Gezien de grote interindividuele variabiliteit tussen de vijf HDs en vijf patiënten met mTNBC, heeft de beperkte groepsomvang waarschijnlijk het identificeren van duidelijke onderscheidende verschillen tussen de twee groepen verhinderd.

Het tweede deel van dit proefschrift, beschreven in **hoofdstukken 6, 7 en 8**, richtte zich op translationeel onderzoek en immunomonitoring binnen klinische studies. Deze onderzoeken evalueerden veranderingen in het immuunsysteem tijdens behandeling en de dynamiek van immuunresponsen bij immuuntherapie, met als doel het identificeren van biomarkers en mechanismen van respons of immunosuppressie.

Hoofdstuk 6 beschrijft de BELLINI-studie, een fase II klinische studie waarin kortdurende

immuuntherapie (anti-PD-1 ± anti-CTLA-4) werd onderzocht bij patiënten met niet-gemetastaseerd TNBC. In de eerste twee cohorten (n=15 elk) kregen patiënten kortdurende immuuntherapie gevolgd door standaard behandeling (chemotherapie en chirurgie). Onze analyses toonden aan dat patiënten met een hoog percentage TILs bijzonder goed reageerden. Deze bevindingen leidden tot de opening van een derde cohort waarin alleen patiënten zaten met ≥50% TILs. In dit derde cohort (ook n=15) werden de patiënten direct geopereerd na de immuuntherapie, zonder chemotherapie. Een majeure pathologische respons (≥90% tumorcel-eradicatie) werd gezien bij 53% van de patiënten, en een pathologisch complete respons (pCR) bij 33%. Flowcytometrie analyses op verse bloedsamples van de patiënten voor en tijdens hun behandeling, liet zien dat responderende patiënten verhoogde niveaus van delende (Ki-67⁺) PD-1⁺ conventionele CD4⁺ T-cellen hadden, met een vergelijkbare trend bij CD8⁺ T-cellen. Deze resultaten tonen aan dat immuuntherapie op zichzelf robuuste immuunactivatie kan induceren bij vroeg-stadium TNBC. Samengevat kan een korte kuur met nivolumab ± ipilimumab vóór chirurgie immuunactivatie induceren in ~60% van de vroege TNBC-gevallen, en bij sterk geïnfilteerde tumoren (TIL ≥ 50%) een pCR opleveren in ~33%, wat een potentieel chemotherapiesparend behandelingschema vertegenwoordigt.

In **hoofdstuk 7** werd onderzocht welke immuunkenmerken geassocieerd zijn met respons op PD-1-blokkade bij patiënten met mTNBC. Hoewel eerder onderzoek vooral gericht was op T-cellen, blijkt effectieve anti-tumorimmunitet afhankelijk van interactie tussen het aangeboren en adaptieve immuunsysteem. Immuunprofilering van gekoppelde bloedmonsters en tumorbipten liet zien dat responders een toename vertoonden van eosinofielen, zowel systemisch als in de tumor; een effect dat bij non-responders ontbrak. Diversen proeven in relevante muismodellen bevestigden de functionele rol van eosinofielen in de respons op immunotherapie. Immuuntherapie bleek de IL-5-productie door CD4⁺ T-cellen te verhogen, wat eosinofielenexpansie vanuit het beenmerg stimuleerde. Toevoeging van cisplatine of recombinant IL-33 verhoogde bovendien de IL-33-spiegels, wat leidde tot verhoogde intratumorale eosinofieleninfiltratie en eosinofiel-afhankelijke activatie van CD8⁺ T-cellen. Deze resultaten onthullen een nieuw mechanisme waarbij eosinofielen bijdragen aan de effectiviteit van immuuntherapie en onderbouwen het potentieel van eosinofiel gerichte therapieën bij borstkanker.

In **hoofdstuk 8** werd een fase I/II-studie beschreven waarin een genetisch geoptimaliseerd HPV-16 E6/E7 DNA-tatoeagevaccin werd getest bij 14 patiënten met HPV16-positieve usual vulvaire intra-epitheliale neoplasie (uVIN), een premaligne aandoening met risico op progressie naar carcinoom. Patiënten ontvingen vier intradermale vaccinaties met twee weken tussenpozen, afwisselend in beide bovenbenen, toegediend via een tatoeageapparaat. Klinische respons werd geëvalueerd aan de hand van digitale fotografie tot 12 maanden na behandeling. T-celresponsen werden bepaald in *ex vivo* assays op

perifere bloedmonsters. De vaccinatie werd goed verdragen; één patiënt kreeg een ernstige onverwachte bijwerking (graad 3). In totaal vertoonden 6 van de 14 patiënten (43%) een klinische respons (2 compleet, 4 partieel). HPV-specifieke T-celresponsen werden gemeten bij 5 patiënten (36%), allemaal met klinisch voordeel. Deze studie toont aan dat HPV-16 E6/E7 DNA-vaccinatie biologisch actief en veilig is bij uVIN en ondersteunt het potentieel van therapeutische vaccinatie als niet-invasieve immuuntherapie voor virus-geïnduceerde premaligne aandoeningen.

Concluderend biedt dit proefschrift een uitgebreid overzicht van hoe borstkankersubtype en ziektefase het immuunsysteem beïnvloeden. Daarnaast worden translationele inzichten gepresenteerd uit klinische studies die gericht waren op het moduleren en monitoren van immuunreacties tijdens immuuntherapie. De bevindingen benadrukken het potentieel van immuuntherapie bij borstkanker, vooral bij TNBC, en onderstrepen het belang van geïntegreerde immuunprofilering voor betere patiëntselectie en effectmeting, met als uiteindelijk doel effectievere behandelingen te ontwikkelen.