

Samenvating in het Nederlands

Inleiding

Dit proefschrift gaat over de behandeling van solide tumoren met immuuntherapie. Het immuunsysteem herkent en bestrijdt niet alleen schadelijke virussen, bacteriën en schimmels, maar kan ook abnormaal groeiend weefsel (tumoren, kanker) herkennen en opruimen. Dit lukt echter niet in alle gevallen. Je spreekt van immuuntherapie als het immuunsysteem ondersteund of gestimuleerd wordt om kankercellen te bestrijden. Bij de behandeling van kanker kan immuuntherapie in aanvulling op chirurgie, chemotherapie of bestraling worden ingezet.

Het immuunsysteem wordt gevormd door een complex samenspel van verschillende typen cellen en chemische signalen. De belangrijkste spelers van het immuunsysteem in dit proefschrift zijn T cellen en dendritische cellen.

Een menselijk lichaam bevat miljoenen subtiel verschillende T cellen. Een bepaald type T cel kan een specifiek eiwitfragment (antigen) – zoals een onderdeel van een virus of een kankercel – herkennen. Een T cel herkent een antigen met behulp van een receptor, de T cel receptor (TCR). Als een T cel zijn antigen herkent, kan het de cel met het antigen direct aanvallen en vernietigen. De dendritische cel (DC) kan antigenen opnemen en in delen aan een T cel ‘laten zien’ (presenteren). Deze kan daardoor worden geactiveerd, aangezet worden tot vermenigvuldigen om vervolgens tumorweefsel aan te vallen met het antigen dat oorspronkelijk door de DC werd gepresenteerd.

Er zijn verschillende typen T cel. Het type dat aanvalt is de cytotoxische T cel. Belangrijk is ook de helper T cel. Deze kan andere celtypen en ook andere T cellen ‘aansporen’ tot grotere activiteit. Voor beide typen T cellen geldt dat ze in eerste instantie naïeve cellen zijn. Deze zijn nog niet in aanraking gekomen met een passend antigen. Zodra dat wel is gebeurd, raken ze ‘geactiveerd’ en vermenigvuldigen ze zich. Daarbij ontstaan twee typen: effector T cellen en memory T cellen. De effector T cellen hebben een korte levensduur, bedoeld voor de acute dreiging. Memory T cellen leven lang en zijn bedoeld voor dreigingen in de toekomst. Er zijn ook weer twee typen memory T cellen: effector memory T cellen en centrale memory T cellen. De diverse typen cellen van het immuunsysteem gebruiken cytokinen – chemische boodschappers – om met elkaar te ‘communiceren’.

Dit proefschrift bestaat uit de volgende delen:

- Deel 1 behandelt immuuntherapie voor de behandeling van hoofdhalsskanker.
- Deel 2 behandelt de rol van het cytokine IL-21 in immuuntherapie.
- Deel 3 behandelt een vorm van immuuntherapie bij de behandeling van kankers van de dikke darm.

Deel 1 immunotherapie voor de behandeling van hoofdhalsskanker

Het onderzoek beschreven in hoofdstuk 2, heeft een nadere analyse van het type T cel in relatie tot het type kanker opgeleverd. Daartoe werden witte bloedcellen uit het bloed van een groep hoofdhalsskanker patiënten onderzocht.

Hoofdhalsskanker kan ontstaan in de mondholte, de larynx (strottehoofd), of de pharynx (keelholte). De belangrijkste risicofactoren bij het krijgen van hoofdhalsskanker zijn roken, drinken en HPV infecties. HPV vormt een groep virussen met uiteenlopende effecten bij infectie. Bij infecties met dit virus kunnen HPV positieve tumoren - dat wil zeggen tumoren die eiwitten van het HPV virus bij zich dragen - ontstaan, vooral uit de pharynx. HPV bestaat uit veel verschillende subtypen waarvan velen waarschijnlijk geen verhoogd risico op kanker geven, maar enkele wel, de zogeheten hoogrisico HPV subtypes.

Een van de belangrijkste resultaten van het onderzoek uit hoofdstuk 2 is dat hoofdhalsskanker patiënten minder T cellen hebben dan gezonde mensen van dezelfde leeftijd. Het aantal effector T cellen is in de patiëntengroep echter relatief groter, terwijl het aantal naïeve T cellen bij hen kleiner is. Binnen de groep van hoofdhalsskanker patiënten bleken de patiënten met HPV positieve tumoren meer effector en effector memory T cellen te hebben dan patiënten met HPV negatieve tumoren. De gegevens over de aantallen en de verdeling van typen T cellen zouden kunnen worden gebruikt om gemakkelijk informatie in te winnen over het te verwachten ziekteverloop bij hoofdhalsskanker patiënten. Dit is echter nu nog niet te zeggen. Over enkele jaren kan er worden uitgezocht of de verkregen informatie over de verschillende T cellen in het bloed van deze patiënten een voorspellende waarde hebben met betrekking tot de 5-jaars overleving.

Hoofdstuk 3 en 4 van dit proefschrift behandelen onderzoek naar mogelijkheden om het immuunsysteem te helpen bij het bestrijden van tumorcellen. Het is mogelijk T cellen te activeren door geschikte dendritische cellen in het laboratorium te maken en deze aan een patiënt toe te dienen. De dendritische cellen worden gemaakt met behulp van monocytten (net als dendritische cellen en T cellen een onderdeel van het immuunsysteem) die gewonnen worden uit het bloed van patiënten of gezonde donoren. De dendritische cellen worden voorzien van antigenen die geassocieerd zijn met de te behandelen tumoren, waardoor tumor specifieke T cellen van de patiënt worden geactiveerd.

Survivin is een antigen dat bij een hoog percentage tumoren waaronder hoofdhalsskanker tumoren in hoge mate wordt geproduceerd en gepresenteerd. Survivin is betrokken bij de celdeling en kan gereguleerde celdood (apoptose) remmen. Apoptose is nodig om weefsel niet ongeremd te laten groeien. In het laboratorium kunnen we dendritische cellen eiwit fragmenten van survivin laten presenteren door het mRNA van survivin in dendritische cellen plaatsen. Het mRNA wordt vervolgens door de dendritische cellen zelf vertaald naar eiwit om daarna te worden gepresenteerd waarmee T cellen kunnen worden gestimuleerd.

Voordat deze techniek op patiënten kan worden getest, is er laboratoriumonderzoek gedaan. Het eerste doel van het laboratoriumonderzoek was het genereren van grote aantallen survivin specifieke T cellen met behulp van het bloed van gezonde donoren. Het bleek mogelijk om kleine aantallen te maken, grote aantallen lukte echter niet: de T cellen gingen dood. De gebruikte technieken voor het maken van grote aantallen waren eerder – bij T cellen met andere specificiteiten – wel succesvol.

Uit nader onderzoek bleek dat geactiveerde T cellen survivin tot expressie brengen en

hier fragmenten van presenteren, waardoor ze een prooi zijn voor survivin specifieke T cellen. Er treedt dus broedermoord op.

De belangrijkste conclusie uit hoofdstuk 3 is dat survivin geen geschikte kandidaat is als antigen voor actieve immunotherapie.

Er zijn ook andere methoden om grote hoeveelheden tumor specifieke T cellen te generen. In hoofdstuk 4 wordt een methode beschreven waarmee T cellen HPV specifiek worden gemaakt door middel van het overbrengen naar de T cel van genetisch materiaal dat de juiste T cel receptor codeert. HPV infecties dragen niet alleen bij aan het ontstaan van bepaalde typen hoofdhalsskanker maar ook bij bijvoorbeeld baarmoederhalsskanker.

Om de genetische code van een specifieke T cel te verkrijgen moet er eerst een kloon worden gegenereerd in het lab. Dit gebeurt door middel van het stimuleren van T cellen met dendritische cellen die het antigen presenteren waarin we zijn geïnteresseerd. Als deze zijn geïdentificeerd, worden de cellen gesorteerd en verder opgekweekt. Er volgt een proces waarbij de specifieke code moet worden gevonden, geïsoleerd en gecontroleerd. In dit geval is de genetische code van de TCR van een cytotoxische T cel gebruikt in helper T cellen. De T cellen met de nieuwe T cel receptoren bleken in staat om HPV specifiek eiwit te herkennen en als reactie het cytokine interferon gamma te produceren. Interferon gamma activeert bepaalde delen van het immuunsysteem. Het onderzoek heeft aangetoond dat T cellen kunnen worden ‘omgebouwd’ om zo tumor specifieke T cellen te genereren.

De discussie (hoofdstuk 5) van dit eerste deel bestaat uit een review waarin verschillende immunotherapeutische strategieën om hoofdhalsskanker tumoren te behandelen worden besproken. Op basis van onze studies en gegevens uit de literatuur kan aangeraden worden om in eerste instantie strategieën te ontwikkelen voor patiënten met HPV positieve tumoren.

Deel 2 IL-21 in immunotherapie

T cellen produceren cytokines waar deze en andere T cellen op reageren. Zo zijn er cytokines die groei stimuleren, cytokines waardoor T cellen langer blijven leven en cytokines die T cellen effectiever maken bij hun opruimwerk. Bij het ontwikkelen van immunotherapeutische strategieën wordt er gekeken naar de eigenschappen van de T cellen die de tumor aanvallen. Ten eerste willen we dat de T cel de tumorcellen kan herkennen. Verder willen we dat het er veel zijn, dat ze goed tumorcellen kunnen doden en persisteren. In onze studies, beschreven in hoofdstuk 6 en 7, zijn de mogelijkheden onderzocht om het cytokine IL-21 in te zetten als versterker van de activiteit van tumorspecifieke T cellen.

Normaal wordt IL-21 geproduceerd door een type helper T cellen, maar het is ook mogelijk om gesynthetiseerde IL-21 direct aan T cellen toe te voegen. Teveel IL-21 zou echter kunnen leiden tot auto-immun ziekten. Lokale productie (in de patiënt) van het cytokine is daarom wenselijk. In dit onderzoek is gekozen voor de productie van IL-21 door DCs (dendritische cellen). Het is mogelijk om dendritische cellen een specifiek antigen te laten presenteren door mRNA in de dendritische cel aan te brengen. Het is met dezelfde techniek ook mogelijk om de dendritische cel behalve het antigen ook IL-21 te laten maken. In het onderzoek beschreven in hoofdstuk 6, zijn de effecten van dendritische cellen met IL-21 en zonder IL-21 op de productie van specifieke T cellen met elkaar vergeleken. De IL-21 toevoeging aan de dendritische cellen zorgt ervoor dat er meer specifieke T cellen

werden aangemaakt. Bovendien waren deze T cellen beter in staat om cellen te doden.

Een vorm van passieve immuuntherapie is het kweken van T cellen afkomstig uit de tumor buiten het lichaam om deze vervolgens in grotere aantallen in de patiënt terug te spuiten. Je spreekt van actieve immuuntherapie wanneer het aanmaken van T cellen in de patiënt zelf wordt gestimuleerd. Bij passieve immuuntherapie kunnen T cellen in het laboratorium worden gestimuleerd door Antigen Presenterende Cellen, zogenaamde APC's. Een dendritische cel is een voorbeeld van een APC. In hoofdstuk 7 wordt beschreven hoe genetisch gemanipuleerde antigen presenterende cellen (aAPC's) T cellen kunnen stimuleren. Tumor infiltrerende lymfocyten zijn witte bloedcellen die in tumoren binnendringen. Door TILs in het laboratorium met aAPC's te stimuleren kunnen er grote hoeveelheden T cellen worden gekweekt. Het onderzoek (hoofdstuk 7) liet zien dat wanneer aAPC's die het cytokine IL-2 produceren, worden gebruikt voor het stimuleren van de tumor infiltrerende lymphocyten er de meeste T cellen ontstaan. Het aantal cytotoxische cellen was echter ten opzichte van de ontstane helper T cellen laag. aAPC's met IL-21 leidden wel tot relatief veel cytotoxische T cellen die bovendien het beste in staat bleken de juiste tumorcellen te doden en tevens hebben ze eigenschappen van T cellen met een lange levensduur.

Dit tweede deel van het proefschrift wordt afgerond met een discussie (hoofdstuk 8) over de toepasbaarheid van IL-21 bij immuuntherapeutische strategieën. Op basis van het uitgevoerde onderzoek en gegevens uit de literatuur raden wij aan om IL-21 niet systemisch in de patiënt toe te passen, maar lokaal te laten produceren.

Deel 3 immuuntherapie bij dikkedarmkankers

Actieve specifieke immuuntherapie (ASI) bestaat uit het terug spuiten van bestraalde tumorcellen in combinatie met het BCG vaccin. Dit vaccin is in de eind jaren tachtig en begin jaren negentig toegepast op een groep stadium II en III darmkanker patiënten (er worden vier kankerstadia onderscheiden). Het bleek dat vooral stadium II darmkanker patiënten minder last hadden van het terugkeren van de tumor na operatieve verwijdering plus ASI therapie vergeleken met patiënten die enkel chirurgie hadden ontvangen (controle groep).

Hoofdstuk 9 beschrijft het onderzoek naar de invloed van de microsatelliet status van de tumoren op het effect van ASI therapie. Tegenwoordig is bekend dat ongeveer 15% van de darmkanker tumoren microsatelliet instabiel (MSI) zijn. MSI zorgt voor vele genetische veranderingen in de genetische opmaak van de tumorcellen, meer dan bij microsatelliet stabiele (MSS) tumoren. Onze oorspronkelijke hypothese was dat deze groep patiënten wel eens het meest baat kon hebben bij ASI therapie. Uit het uitgevoerde retrospectief onderzoek bleek echter dat de overleving van deze groep patiënten al zodanig hoog was dat er geen ruimte voor verbetering overbleef door ASI therapie. Het bleken vooral de kleinere MSS tumoren te zijn waar ASI therapie het meeste effect op had. Wanneer deze patiënten ASI therapie ontvingen, gingen er minder van hen aan de ziekte dood en hadden er ook minder van hen last van het terugkeren van de tumor in de 15 jaar dat zij gevolgd zijn.

In hoofdstuk 10 wordt beschreven hoe in deze zelfde patiëntengroep een analyse is gemaakt van het aantal T cellen en CD8 positieve T cellen. Het bleek dat patiënten met MSI tumoren meer tumor infiltrerende T cellen hebben dan patiënten met MSS tumoren. Tevens is de algehele overleving onderzocht van patiënten met hoge T cel infiltraten vergeleken

met patiënten met lage T cel infiltraten. Patiënten met hoge infiltraten hebben een betere overleving en minder kans op recidieven. Vervolgens is onderzocht of ASI therapie meer effect heeft op patiënten die veel T cellen in hun tumor hadden of op patiënten met weinig T cellen in hun tumor. Er is alleen naar patiënten met MSS tumoren gekeken. Resultaat: patiënten met hoge T cel infiltraten in het stroma (steunweefsel) van de tumor hebben baat bij ASI therapie.

Het derde en laatste deel van het proefschrift wordt afgerond met een discussie (hoofdstuk 11). Op basis de retrospectieve studies beschreven in hoofdstuk 9 en 10 kan een betere inschatting worden gemaakt over welke patiëntengroep baat heeft bij ASI therapie.