

Hematopoïetische Stamceltransplantatie als vorm van Immunotherapie; het allogene Graft-Versus-Kanker effect

Gerda de Vries (s1693506)

Universitair Medisch Centrum Groningen, Groningen, Nederland

Datum: 23-06-2010

Begeleider: Dr. Wijnand Helfrich, Chirurgisch Onderzoekslaboratorium, Afd.
Chirurgie,UMCG

Samenvatting

Allogene hematopoietische stamceltransplantatie (HSCT) wordt ingezet als reddingsmiddel bij letale beenmerg toxiciteit na hoge dosis chemoradiatie bij bijvoorbeeld leukemie. HSCT kan echter ook immuuntherapeutisch worden ingezet bij deze ziekte, zelfs in vergevorderde stadia. De ingespoten donor CD4+, CD8+ en NK-cellen geven namelijk een sterk graft-versus-leukemia (GVL) effect in de patiënt. Probleem is echter dat dit effect wordt beperkt door de graft-versus-host-ziekte (GVHZ). T-cel depletie van het transplantaat kan de GVHZ compleet opheffen, maar dit heft ook het GVL effect op. Gezocht wordt naar een methode waarbij GVL effect van donor lymfocyten wordt versterkt of behouden, zonder daarbij de uiterst gevaarlijke GVHZ te induceren.

Voor immuuntherapie bij kanker kan ook allogene adoptieve T-cel therapie worden toegepast, waarbij deze T-cellen specifiek zijn gericht tegen zogenaamde “minor histocompatibility antigens”. Dergelijke antigenen zijn in principe normale eiwitten die echter van persoon tot persoon kleine verschillen kunnen bevatten. In gebracht in een patiënt herkennen dergelijke T-cellen de tumor cellen van de acceptor op basis van deze minieme verschillen.

In deze scriptie zal worden ingegaan op HSCT als immuunmodulerende therapie. Verschillende methoden zullen aan bod komen, waaronder het gebruik van “minor histocompatibility antigens”, en de huidige stand van zaken zal worden weergegeven. Ook zal er worden ingegaan op de vooruitzichten in het onderzoek naar HSCT als immuunmodulerende therapie. Het zou therapeutisch enorm van belang zijn wanneer het GVL selectieve kan worden behouden of versterkt in afwezigheid van GVHZ. Meer inzicht hierin moet het mogelijk maken om geschikte donoren te selecteren op basis van histocompatibiliteit en lymfocyt repertoire.

Inhoudsopgave

1. Inleiding	4.
2.1 Mechanisme	6.
2.1.1 T-helper cellen en Cytotoxische T-cellen	6.
2.1.2 Natural Killer cellen	7.
2.2 Immuunmodulerende therapie	8.
2.2.1 Donor lymfocyten infusie	8.
2.2.2 Toepassing: Graft-versus-myeloom	8.
2.2.3 Toepassing: Graft-versus-lymfoom	9.
2.2.4 Toepassing: Graft-versus-solide tumor	9.
2.2.5 Immuunsuppressie	9.
2.3 Targets voor een graft-versus-kanker effect	9.
2.4 Vooruitzicht	10.
3 Discussie	12.
4 Referenties	14.

1. Inleiding

In Nederland is kanker sinds een aantal jaren doodsoorzaak nummer 1 voor mannen. De overlevingskansen van kankerpatiënten zijn langzaam gestegen in de afgelopen decennia. Redenen hiervoor zijn dat kanker tegenwoordig vaker in een vroeg stadium wordt ontdekt en dat de behandelingen steeds effectiever worden. Hoewel de overlevingskans van de kankerpatiënt sterk afhankelijk is van het soort kanker en van het stadium waarin de diagnose wordt gesteld, geneest ruwweg slechts de helft van alle kankerpatiënten. Om deze reden wordt er dan ook heel veel onderzoek naar nieuwe behandelingsmethoden gedaan. Een tak van onderzoek richt zich op de immuuntherapie, een behandeling waarbij het immuunsysteem versterkt en gemanipuleerd wordt om kanker te bestrijden. Binnen de immuuntherapie zijn er verschillende vormen te onderscheiden waarvan de meest bekende vorm waarschijnlijk de behandeling van kanker is met gehumaniseerde monoklonale antilichamen. In de kliniek wordt deze vorm van therapie al een aantal jaren toegepast, waarvan waarschijnlijk het meest bekende voorbeeld de behandeling van borstkanker is met behulp van het antilichaam trastuzumab.

In deze scriptie zal worden ingegaan op allogene hematopoietische stamceltransplantatie (HSCT) als immuunmodulerende therapie. Voorheen werd HSCT vooral gezien als reddingsmiddel bij levensbedreigende beenmerg toxiciteit na een hoge dosis chemoradiatie. In deze scriptie wordt vanuit een ander perspectief naar HSCT gekeken en wordt het als een veel belovende vorm van immuuntherapie onder de loep genomen. De behandeling van leukemie en andere aandoeningen aan het hematopoietische systeem is gebaseerd op onderzoek uit de jaren '50. Uit onderzoek naar leukemie in muizen werd duidelijk dat bestraling in klinisch tolereerbare dosis niet in staat was om leukemie te genezen, terwijl eerder Barnes *et al* (1956) de genezing van leukemie in bestraalde muizen na allogene beenmerg transplantatie al wel hadden beschreven. Het idee was dat behandeling met een hoge stralingsdosis gegeven kon worden ongeacht de toxiciteit voor het beenmerg, waarna een beenmergtransplantatie van een gezonde donor voor redding kon zorgen. Later werd bekend dat de T-cellen in het transplantaat mogelijk een graft-versus-leukemie (GVL) effect hadden. Het GVL effect werd gezien zowel in combinatie met de graft-versus-host-ziekte (GVHZ), maar frequent ook in afwezigheid ervan. Echter, er zijn verschillende onafhankelijke onderzoeken die hebben laten zien dat tweelingen met een HSCT die geen GVHZ ontwikkelden een verhoogde kans op een terugval van leukemie hadden, in vergelijking met leukemie patiënten die als donor een humane leukocyten antigeen (HLA)-identieke broer of zus hadden. Verdere ondersteuning van een immuun-gemedieerd GVL effect wordt gegeven door onderzoeken waaruit bleek dat T-cel depletie van het transplantaat effectief de GVHZ kon voorkomen, maar dat dit ook leidde tot een significante toename van het risico op een terugval (Ringden *et al*, 2009).

Veel onderzoek heeft zich sindsdien gericht op de associatie tussen GVHZ en het GVL effect. Een uitdaging in het onderzoek naar HSCT voor de behandeling van leukemie en andere vormen van kanker is het voorkomen van de GVHZ zonder dat het graft-versus-kanker (GVK) effect verloren gaat. De hoofdvraag waar deze scriptie een antwoord zal proberen op te geven is:

- **Hoe kun je optimaal gebruik maken van het graft-versus-kanker effect terwijl tegelijkertijd de graft-versus-host-ziekte zoveel mogelijk wordt voorkomen?**

Hiervoor zijn verschillende methoden onderzocht, waaronder het gebruik van “minor histocompatibility antigenen” (MHag) die gepresenteerd worden in de context van major histocompatibility complex (MHC) klasse I moleculen. Deze MHag's worden gecodeerd door genen specifiek voor het hematopoietische systeem, en kunnen verschillen tussen donor en patiënt. Dit heeft het voordeel dat de donor T-cellen deze MHag's van de patiënt herkennen en kunnen opruimen. Een nadeel is echter dat er naast inductie van GVL ook inductie van het schadelijke GVHZ kan plaatsvinden. De GVHZ is nog steeds de hoofdoorzaak van aan transplantatie gerelateerde morbiditeit en mortaliteit. Kolb *et al* hebben in 1990 een onderzoek gepubliceerd waar de toepassing van donor lymfocyten infusie na allogene stamceltransplantatie werd geïntroduceerd. Hieruit bleek dat donor lymfocyten infusie het GVL effect na een allogene stamceltransplantatie kon versterken. Het eerste bewijs was geleverd dat lymfocyten een blijvende regressie van leukemie kon induceren zonder dat er chemo- of radiotherapie werd gegeven. Andere methoden om een anti-tumor effect te induceren

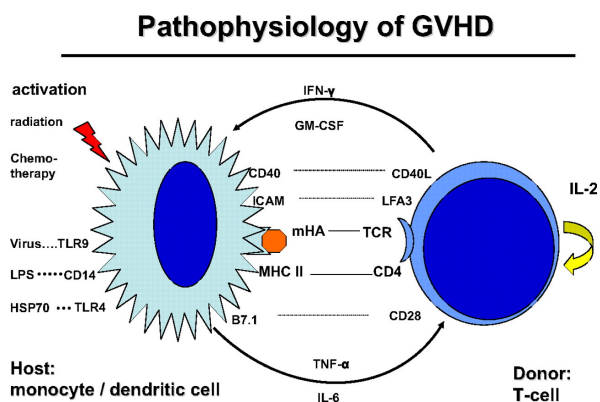
richten zich bijvoorbeeld op tumor specifieke antigenen, of op T-cel receptor genen en deze zullen hier ook worden besproken.

2.1 Mechanisme

Het mechanisme van het graft-versus-leukemie (GVL) effect is nog niet geheel bekend. Echter, het GVL effect is sterk geassocieerd met de graft-versus-host-ziekte (GVHZ), waardoor het aannemelijk is dat het door een soortgelijk mechanisme wordt gemedieerd. GVHZ ontstaat wanneer de T-cellen, afkomstig van de donor, worden geactiveerd door de herkenning van antigenen die niet in de donor tot expressie komen. De mate waarin deze antigenen worden herkend als vreemd door de T-cellen is ervan afhankelijk of het transplantaat van een HLA-gematchte of HLA-gemismatchte donor afkomstig is (Ringden *et al*, 2009). In een HLA-gemismatcht transplantaat kan de alloreactieve T-cel respons zich richten tegen zowel het HLA molecuul zelf, als tegen antigen-HLA complexen die gevormd worden. De alloreactieve T-cel respons in HLA-gematchte transplantaten daarentegen, richt zich alleen tot de antigenen die zijn afgeleid van eiwitten van polymorfe genen die uitsluitend in de ontvanger tot expressie komen. Deze worden de “minor histocompatibility antigenen” (MHag) genoemd (Goulmy, 2006). De donor T-cellen kunnen het GVL effect aanmoedigen door verschillende mechanismen, waaronder een cytokine gemedieerd traject of door directe cytolytische activiteit. De directe cytolytische activiteit van T-cellen kan verlopen via Fas-FasL geïnduceerde apoptose of door perforine/granzym degranulatie (Ringden *et al*, 2009).

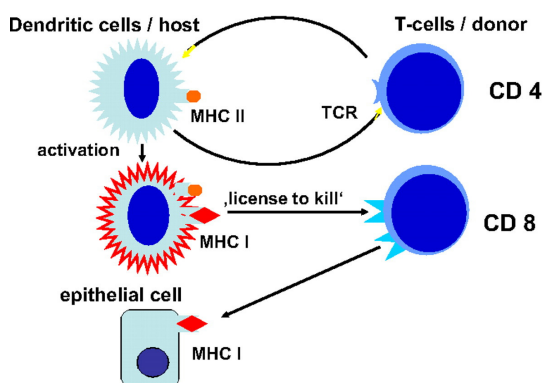
2.1.1 T-helper cellen en cytotoxische T-cellen

Donor T-cellen worden gestimuleerd door dendritische cellen (DC) van de ontvanger die MHag's presenteren (Figuur 1). Stimulatie van de T-helper (Th) cel, of CD4+ T-cel, vindt plaats door het major histocompatibility complex (MHC) klasse II antigen complex dat zich op het celoppervlak van de DC bevindt. Aanvullende signalen zijn nodig om de Th-cellen te activeren, dit gebeurt via co-stimulatoire moleculen, adhesie moleculen en stimulatorische cytokinen (Kolb, 2008). Deze GVHZ-achtige reactie wordt gezien na een syngene en zelfs autologe transplantatie. Echter, na enkele dagen behandeling met steroïden zakt deze reactie af. Na een allogene transplantatie daarentegen, wordt de reactie behouden door de herkenning van MHag's door de Th-cellen. Antigen presenterende cellen (APC) kunnen vroegtijdig worden geactiveerd door behandeling met bestraling of chemotherapie. Dit leidt tot een versnelde stimulatie van de Th-cellen die als reactie hierop cytokinen afstaan. Dit resulteert in een vicieuze cirkel, wat ook wel de cytokine storm wordt genoemd. Het APC kan ook geactiveerd worden door een bacteriële of virale infectie via de Toll-like receptoren. De activatie van DC leidt niet alleen tot stimulatie van de Th-cellen, maar ook tot activatie van de cytotoxische T-cellen (CTL) of CD8+ T-cel. Dit gebeurt door de presentatie van antigenen in de context van een MHC klasse I molecuul (Figuur 2). De geactiveerde DC geven de CTL een ‘license to kill’.



Figuur 1. Pathofysiologie van GVHZ: de donor T-cel stuit op een antigen presenterende cel. Activatie vindt plaats door behandeling met radio- of chemotherapie, kan echter ook door virale/bacteriële infectie (viraal: via toll-like receptor (TLR); bacterieel: via lipopolysacharide (LPS), CD14 of TLR). De interactie is gebaseerd op de herkenning van MHag in de context van CD4 en MHC klasse II. De reactie wordt verder gestimuleerd door co-stimulatoire moleculen. (Kolb, 2008).

Pathophysiology of GVHD



Figuur 2. Pathofysiologie van GVHZ. De interactie tussen de donor T-cel en de APC leidt tot de activatie van de APC en de presentatie van MHAg in de context van MHC klasse I, wat een 'license to kill' geeft aan CD8+ cellen. (Kolb, 2008).

DC met een leukemische oorsprong zijn reeds beschreven voor chronische myeloïde leukemie (CML). Deze DC kunnen MHAg's of leukemie specifieke antigenen presenteren aan de donor lymfocyten. Voor CML voorloper cellen loopt de differentiatie tot DC waarschijnlijk spontaan. Hetzelfde geldt voor andere aandoeningen aan het hematopoïetische systeem, en doorgaans zou deze differentiatie ook geïnduceerd kunnen worden met een combinatie van cytokinen. Resistentie tegen de inductie van GVHZ zou kunnen worden veroorzaakt doordat de DC van de patiënt vervangen worden door de DC geproduceerd door het transplantaat, of doordat de patiënt niet-stimulatoire DC produceert waardoor deze er niet in slagen om de donor T-cellen te stimuleren (Kolb, 2008).

Het GVL effect wordt behouden doordat de van de patiënt afkomstige DC de donor T-cellen blijven stimuleren. De Th-cellen kunnen als respons zelf cytotoxisch worden, of ze kunnen via de DC de CTL cellen activeren. In een studie naar syngene transplantatie bij tweelingen werd geen GVL effect gezien (Kolb *et al*, 1995), terwijl in patiëntgroepen met een allogene hematopoïetische stamceltransplantatie (HSCT) een regressie werd waargenomen. Om de GVHZ te voorkomen na HSCT is er gekeken naar T-cel depletie van het transplantaat, echter werd hierdoor de kans op een terugkeer van kanker significant groter. Dit geeft aan dat donor T-cellen het GVL effect medieren. Dezelfde onderzoeken lieten zien dat er geen significant GVL effect plaats vond na syngene stamceltransplantatie. Hieruit wordt duidelijk dat alleen de aanwezigheid van T-cellen in het transplantaat niet genoeg is voor een GVL effect, maar dat allogene T-cellen essentieel zijn voor het antitumor effect.

2.1.2 Natural Killer cellen

Natural killer (NK) cellen brengen het oppervlakte eiwit Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) tot expressie. Dit eiwit geeft de NK-cellen een cytotoxische functie doordat het bindt aan MHC klasse I moleculen die tot expressie worden gebracht op alle kerndragende lichaamcellen. Deze interactie maakt het mogelijk om virus geïnfecteerde cellen of tumor cellen op te sporen. Een lage MHC klasse I expressie is namelijk kenmerkend voor deze cellen. De meeste KIRs hebben een remmende werking, wat betekent dat de herkenning van het MHC klasse I complex remming geeft aan de cytotoxische activiteit van de NK-cellen.

Het GVL effect lijkt het meest effectief tijdens de eerste 6 maanden na transplantatie. Yu *et al* (2009) hebben laten zien dat NK-cellen die een remmende KIR tot expressie brengen veel intracellulair interferon-gamma (IFN- γ) bezaten tijdens de eerste maanden na transplantatie, maar dat de hoeveelheid daalde na verloop van tijd. De onderzoekers suggereerden dat NK-cellen geleidelijk tolerant worden voor 'zelf' rond dag 100 na de transplantatie. Het blijkt dat NK-cel alloreactiviteit een GVL effect kan induceren en dit wordt het meest gezien bij een haplo-identieke T-cel ledige stamceltransplantatie. In mindere mate wordt dit ook gezien na een HLA-gematchte T-cel ledige stamceltransplantatie (Ringden *et al*, 2009). Als de antigenen die op de cellen van de patiënt tot expressie worden gebracht tot een andere groep behoren dan die van de donor, dan worden de NK-cellen niet geremd en zorgen voor een sterk GVL effect. De NK-cellen kunnen de hematopoïetische cellen van de patiënt opruimen, waaronder de leukemische cellen, zonder dat er GVHZ ontstaat. Verschillende onderzoeksgroepen hebben geen NK-cel gemedieerde GVL respons kunnen aantonen,

maar in deze onderzoeken werd ook geen gebruik gemaakt van T-cel depletie van het transplantaat zoals de groep van Ruggeri wel heeft gedaan (Ruggeri *et al*, 2002). Door het gebruik van een HSCT zonder T-cel depletie wordt het lastiger om een GVL effect, gemedieerd door NK-cellen, te observeren doordat het GVL effect gemedieerd door T-cellen waarschijnlijk sterker is. Onderzoek in muizen heeft aangetoond dat ook NK-cellen de capaciteit hadden om solide tumoren te bereiken, te infiltreren, en selectief kwaadaardige cellen te doden zonder te reageren op gezonde cellen.

2.2 Immuunmodulerende therapie

2.2.1 Donor lymfocyten infusie (DLI)

De gedachte achter donor lymfocyten infusie (DLI) is om het anti-tumor effect te verbeteren door de ontwikkeling van de GVHZ te promoten. Deze vorm van immunotherapie heeft het vermogen om kanker uit te roeien, maar het kan ook in fatale GVHZ resulteren. De cellen die gebruikt worden voor DLI worden verkregen door gebruik te maken van leukoferese. Dit is een techniek waarbij bloed wordt afgenomen, waarna de witte bloedcellen eruit worden gefilterd en voor transfusie worden gebruikt. De kans op de ontwikkeling van GVHZ wordt verminderd door stijgende doses van DLI te gebruiken, met als startconcentratie 1×10^5 T-cellen/kg (Ringden *et al*, 2009). De dosis die wordt gegeven aan de patiënt hangt af van de HLA-compatibiliteit tussen donor en patiënt, en het tijdstip na transplantatie.

In 1990 hebben Kolb *et al* het bewijs gegeven voor een GVL effect na DLI bij recidiverende chronische myeloïde leukemie (CML). Dit werd later door andere onderzoeken bevestigd, waarbij complete regressie werd gezien in 70-80% van de patiënten met recidiverende CML (Ringden *et al*, 2009). Bovendien leek het erop dat de regressie, geïnduceerd door DLI, blijvend was met een kans van 10% op nog een recidief. De resultaten bij andere hematologische ziekten waren echter niet zo veelbelovend als voor CML. Bij recidiverende acute myeloïde leukemie (AML) waren de percentages van patiënten met regressie na DLI maar 15% (Collins *et al*, 1997) tot 29% (Kolb *et al*, 1995), en bij een meerderheid van de patiënten was deze regressie niet blijvend. Hetzelfde gold voor recidiverende acute lymfatische leukemie (ALL) waar een respons van minder dan 25% werd geobserveerd (Kolb *et al*, 1995; Collins *et al*, 1997). Waarom DLI bij CML erg goed werkt en bij AML en ALL minder is nog niet bekend, maar het zou mogelijk te maken kunnen hebben met de kans op het ontwikkelen van GVHZ en de tragere ontwikkeling van CML. Een belangrijke voorspeller voor de effectiviteit van DLI is de tijd die er zit tussen HSCT en een terugkeer van kanker. Hoe eerder een recidiverende tumor kan worden gevonden hoe beter de therapie zal aanslaan, omdat de therapie zich dan kan richten op een veel kleinere tumor.

2.2.2 Toepassing: Graft-versus-myeloom

Naast CML is er ook onderzoek gedaan naar andere vormen van leukemie zoals myelodysplastisch syndroom en acute myeloïde leukemie (AML). Meerdere studies waarin myeloma patiënten DLI ontvingen, hebben aangetoond dat een graft-versus-myeloom effect plaats kan vinden (Ringden *et al*, 2009). Deze onderzoeken hebben aangetoond dat DLI, in patiënten met een recidief na HSCT, regressie van kanker kan induceren. Bovendien bleek dat chronisch GVHZ significant gecorreleerd was met complete genezing in myeloma patiënten. De behandeling van deze vormen van kanker met DLI is echter minder effectief gebleken dan het was bij CML (Kolb *et al*, 1995; Collins *et al*, 1997). Een reden hiervoor kan zijn dat deze ziekte zich heel snel ontwikkelt, waardoor de vorming van kanker het GVL effect in kan halen. Een GVL reactie kan namelijk meerdere maanden nodig hebben om tot stand te komen (Kolb, 2008). Om deze reden wordt er vaak chemotherapie gegeven voorafgaand aan de DLI. Er is echter nog een reden waarom AML minder goed reageert op DLI. In meer dan 80% van de patiënten wordt er geen CD86, een co-stimulator molecuul, tot expressie gebracht, waardoor ze waarschijnlijk aan de immunorespons kunnen ontsnappen. Verder is het zo dat een terugval van AML na allogene stamceltransplantatie vaak buiten het beenmerg plaatsvindt en DLI hebben hierdoor zelden effect (Kolb, 2008). Dit wijst erop dat het GVL effect niet effectief is tegen tumoren op plaatsen buiten het beenmerg.

2.2.3 Toepassing: Graft-versus-lymfoom

De respons van acute lymfatische leukemie (ALL) op DLI is over het algemeen minder goed dan voor myeloïde leukemie (Kolb *et al*, 1995; Collins *et al*, 1997), hoewel er wel successen zijn geboekt. Langdurige regressie van leukemie is vooral gevonden in patiënten die een intensieve chemo- of radiotherapie hebben ondergaan vooraf aan de DLI. De respons van B-cel ALL op chemotherapie en DLI is niet zozeer anders dan bij AML, maar de tijd tot een terugval is vaak korter. Dit in tegenstelling tot T-cel ALL en T-cel lymfomen. Deze vormen van kanker reageren goed op DLI met langdurige effectiviteit. Nijmeijer *et al* (2002) hebben in een diermodel voor ALL donor CD8+ T-cellen gevonden die een paar weken na transplantatie uitgeschakeld waren, wat resulteerde in een terugkeer van de leukemie. Het GVL effect zou bij ALL snel na de HSCT moeten plaatsvinden om effectief te zijn.

The European Group for Blood & Marrow Transplantation hebben het graft-versus-lymfoom effect nader onderzocht. In dit onderzoek zijn de resultaten van syngene en allogene stamceltransplantaties vergeleken voor lymfomen met een hoge of lage gradering. Voor de lymfomen met een lage gradering werd er geen verschil gezien in de kans op een recidief na syngene of allogene transplantatie, en voor beide gold dat de kans op een recidief kleiner was dan na een autologe transplantatie. De verschillen in de kans op terugval van lymfomen met een hoge gradering waren niet significant tussen syngene, allogene en autologe transplantatie (Biermann *et al*, 2003). Maar zoals hierboven beschreven staat, zijn er wel onderzoeken die positieve resultaten hebben laten zien voor een allogen graft-versus-lymfoom effect voor verschillende typen leukemie.

2.2.4 Toepassing: Graft-versus-solide tumor

Het meeste onderzoek naar immunotherapie voor solide tumoren is gedaan in niercelcarcinomen. Onderzoek van Childs *et al* (2000) heeft aangetoond dat er een graft-versus-tumor (GVT) effect plaatsvindt na DLI bij een niercelcarcinoom. Ander onderzoek heeft complete regressie van niercel kanker aangetoond na DLI. Bewijs voor een GVT effect bij andere vormen van solide tumoren zijn ook al beschreven (Ringden *et al*, 2009). De voorspellende factoren voor een GVT effect zijn over het algemeen; een niet vergevorderde ziekte, goede klinische prestaties van de patiënt en het optreden van de GVHZ. Het is mogelijk dat solide tumoren MHag's tot expressie brengen die normaal gesproken beperkt waren tot het hematopoïetische systeem. Stimulatie van T-cellen bij niercel kanker kan ook worden veroorzaakt door een virale infectie, zoals het endogene retrovirus dat specifiek is voor niercel kanker. Recentelijk is uit onderzoek gebleken dat het stroma ook een belangrijke rol zou kunnen spelen in solide tumoren. Het stroma stimuleert tumorcellen via groeifactoren en het zou relevant kunnen zijn voor de antigen presentatie (Kolb, 2008).

2.2.5 Immuunsuppressie

T-cel depletie van het transplantaat kan de GVHZ compleet opheffen, maar dit gaat wel gepaard met een verhoogde kans op recidiverende leukemie (Falkenburg *et al*, 2002). Bij gebruik van een mix cultuur van T-cellen is het mogelijk om de alloreactieve T-cellen te verwijderen door de behandeling met een anti-CD25 antilichaam *in vitro*. De overgebleven niet-alloreactieve T-cellen met behouden GVL effect kunnen aan de patiënt gegeven worden met de hoop op een betere immunorespons terwijl de GVHZ wordt voorkomen.

De meest gebruikte immunosuppressiva om GVHZ te voorkomen zijn methotrexaat gecombineerd met een calcineurine remmer zoals cyclosporine of tacrolimus (Ringden *et al*, 2009). Deze therapie heeft geresulteerd in minder acute en chronische GVHZ. Echter, dit effect heeft ook geleid tot een wat verzwakt GVL effect en een verhoogde kans op een recidief. De meeste immunosuppressiva zorgen, net als methotrexaat en calcineurine remmers, voor een efficiënte afname van de GVHZ maar zorgen ook voor een verzwakking van de GVL respons.

2.3 Targets voor een graft-versus-kanker effect

Bij de graft-versus-kanker (GVK) respons ontbreekt de specificiteit waardoor ook gezond weefsel aangedaan kan worden. Dit kan uiteindelijk leiden tot mogelijke morbiditeit en mortaliteit geassocieerd met de GVHZ. Om een recidief in leukemie patiënten te voorkomen is er gekeken naar

het gebruik van overdracht van leukemiespecifieke T-cellen om het GVL effect goed te benutten zonder het risico op GVHZ te vergroten (Falkenburg *et al*, 1999). Het idee achter deze adoptieve T-cel therapie is om grote aantallen antigen specifieke T-cellen *in vitro* te genereren. Deze kunnen later via een infuus aan de patiënt worden gegeven, met als doel een immuunrespons op te wekken die de overgebleven leukemiecellen zal opruimen. Er is al veel bewijs geleverd dat de transfer van T-cellen een positief effect kan hebben op vele ziekten en infecties *in vivo* (Falkenburg *et al*, 1999; Cobbold *et al*, 2005). De grootste uitdaging bij adoptieve T-cel therapie is het vinden van tumor of pathogeen specifieke antigenen die alleen door de tumorcellen, van virale of niet-virale oorsprong, of pathogenen tot expressie worden gebracht. Deze vorm van therapie is namelijk zowel getest voor tumoren als voor chronische infecties. Pathogeen of tumor specifieke T-cellen kunnen gegenereerd worden op verschillende manieren. Specifieke T-cellen kunnen uit de donor worden gehaald en gelijk worden overgedragen aan de patiënt zonder enige *in vitro* expansie. Een tweede manier is om de T-cellen *in vitro* te laten vermeerderen in het bijzijn van APC's die tumor of pathogeen specifieke antigenen presenteren op hun oppervlak (Cobbold *et al*, 2005). Het selecteren en vermeerderen van specifieke T-cellen tegen bepaalde vormen van kanker, zoals onder andere AML en ALL, is moeilijker. Dit komt doordat de veronderstelde antigenen die worden herkend door de T-cellen vaak niet alleen door de kanker cellen tot expressie worden gebracht. Dit leidt tot mogelijk een veiligheidsprobleem van de therapie aangezien er een ernstige GVHZ kan ontstaan.

Recentelijk is er een manier beschreven om dit probleem te omzeilen. Namelijk door de genoverdracht van een relevant T-cel receptor gen, waarvan de specificiteit bekend is, naar een T-cel populatie (Ringden *et al*, 2009). Door deze strategie zullen donor T-cellen *in vitro* worden uitgerust met een T-cel receptor met een goed gekarakteriseerde specificiteit. Toediening van de T-cellen in de patiënt zou dan voor een immuunrespons tegen tumor specifieke antigenen kunnen zorgen. Het gebruik van genetisch gemodificeerde T-cellen voorzien van 'suicide genes' zal mogelijk leiden tot betere veiligheid en een meer efficiënte therapie. De eerste klinische trials zijn al uitgevoerd met veelbelovende resultaten (Ciceri *et al*, 2009).

Een andere categorie van antigenen voor het creëren van een T-cel respons zijn de orgaan specifieke antigenen, welke tot expressie worden gebracht op zowel kwaadaardige als gezonde cellen. Het voordeel van deze antigenen is dat ze veel en consistent tot expressie worden gebracht in tegenstelling tot de tumor specifieke antigenen. Echter, er hangt ook een groot nadeel aan vast. Therapie met orgaan specifieke T-cellen zou veel orgaan of weefsel schade kunnen veroorzaken, wat mogelijk leidt tot hoge morbiditeit en mortaliteit. Onderzoek naar het gebruik van deze aanpak heeft wel positieve resultaten laten zien bij niet vitale organen zoals bijvoorbeeld de borstklieren (Ringden *et al*, 2009). Deze therapie zal echter niet geschikt zijn tegen antigenen van vitale organen.

Een laatste groep van antigenen die als doelwit kunnen dienen om een GVK effect uit te lokken zijn de tumor geassocieerde antigenen van virale of cellulaire oorsprong. De tumor geassocieerde antigenen worden selectief tot overexpressie gebracht op kwaadaardige cellen en komen niet of nauwelijks voor op gezonde cellen. Een paar van deze antigenen zijn al beschreven in de literatuur waarvan de best gekarakteriseerde Wilms Tumour antigen 1 (WT1) en mucine (MUC)1 zijn. Het WT1 gen heeft een oncogene functie en komt bij veel aandoeningen tot overexpressie, hierdoor is het WT1 antigen een bruikbare tumor marker. In klinische trials is de werkzaamheid van WT1 vaccinatie in mensen al aangetoond (Oka *et al*, 2008). In een ander onderzoek werd duidelijk dat een CD8+ T-cel respons tegen WT1 plaatsvond in patiënten met ALL nadat ze stamceltransplantatie hadden ondergaan, en dit was geassocieerd met een verbetering van de ziekte en een verminderde kans op een recidief (Ringden *et al*, 2009). Het MUC1 antigen komt tot overexpressie in patiënten met AML. Uit onderzoek bleek dat het antigen in staat was om een specifieke T-cel respons uit te lokken *in vivo*, na vaccinatie van de patiënten met DC die MUC1 peptides presenterden. Ook werd een positieve correlatie gezien tussen de aanwezigheid van een MUC1 gerichte T-cel respons en de kans op een terugval (Ringden *et al*, 2009).

2.4 Vooruitzicht

Het aantal patiënten met een verhoogde kans op het ontwikkelen van GVHZ neemt toe, vooral nu er steeds meer HSCT uitgevoerd worden van niet verwante donoren. Alhoewel onze kennis over deze

aandoening ook toeneemt is er tot nu toe nog geen oplossing voor gevonden. Schadelijke bijwerkingen door infecties of een terugkeer van de ziekte vormen een uitdaging voor het ontwikkelen van nieuwe benaderingen. Meerdere takken van onderzoek richten zich op de ontwikkeling van een immuunmodulerende therapie en zullen waarschijnlijk het meest succesvol zijn wanneer zij ingezet worden in de beginfase van het ziekteproces. In de afgelopen 50 jaar is het gebruik van HSCT steeds meer een vorm van immuuntherapie geworden, waarbij getracht wordt het optimale GVK effect te gebruiken. Tegenwoordig krijgen de meeste patiënten therapie volgens standaard protocollen gebaseerd op HLA-compatibiliteit tussen donor en patiënt. In de nabije toekomst zou een meer individuele behandeling mogelijk moeten zijn. Therapie op basis van het risico op de ontwikkeling van de GVHZ en het risico op een recidief zouden helpen om het GVK effect zo goed mogelijk te benutten voor de behandeling van kanker. Door deze risicobeoordeling zal het ook mogelijk zijn om patiënten met een verhoogde kans op de ontwikkeling van de GVHZ aanvullende immunosuppressiva te geven. Verder is een meer specifiek GVK effect gewenst. De donor lymfocyten moeten zich specifiek richten tegen antigenen die met voorkeur alleen op de tumorcellen tot expressie komen, zonder dat de reactie schade aanricht aan gezond weefsel. Voor adoptieve T-cel therapie zijn al positieve resultaten geboekt (Falkenburg *et al*, 1999; Cobbold *et al*, 2005). De uitdaging is nu om naar nieuwe specifieke antigenen te zoeken die als target kunnen dienen. Ook adoptieve NK-cel therapie heeft zijn effectiviteit al bewezen. Selectie van donoren voor NK-cel therapie op basis van voorspelde alloreactiviteit tegen de patiënt is al door vele onderzoeksgroepen onderzocht (Ringden *et al*, 2009). Additionele klinische trials hebben laten zien dat een KIR ligand mismatch geassocieerd was met een gunstige uitkomst voor myelogene leukemie. In de toekomst zal HSCT waarschijnlijk de eerste stap zijn in een reeks immuunmodulerende therapieën. Kanker specifieke T-lymfocyten, allogene NK-cellen, kanker specifieke antilichamen en eiwit remmers kunnen toegevoegd worden aan de HSCT in een individueel ontworpen protocol voor elke patiënt, om het anti-kanker effect optimaal te benutten en de overlevingskansen te verbeteren.

3. Discussie

In de afgelopen jaren is de kijk op stamceltransplantatie veranderd. De kracht van het GVL effect heeft de wetenschap aangemoedigd tot het gebruik van donor lymfocyten voor adoptieve immunotherapie. De omstandigheden voor een GVL effect, zonder de ontwikkeling van de GVHZ, zijn tegenwoordig beter gedefinieerd maar nog altijd is er ruimte voor nieuwe kennis. De toepassing van DLI na HSCT heeft al veelbelovende resultaten laten zien voor de behandeling van recidiverende CML (Ringden *et al*, 2009). Echter, niet alle vormen van kanker zijn even gevoelig voor deze vorm van immunotherapie. Collins *et al* (1997) vonden bij slechts 15% van de patiënten een regressie van recidiverende AML na DLI, en Kolb *et al* (1995) vonden een percentage van 29% onder de patiënten. Ook voor recidiverende ALL waren de resultaten niet erg veelbelovend met een respons percentage lager dan 25%. Bovendien bleek de geobserveerde regressie niet blijvend. Deze resultaten wijzen erop dat myeloïde aandoeningen beter reageren op DLI dan lymfoïde aandoeningen. Waarom deze vormen van kanker minder gevoelig zijn voor DLI is nog niet geheel bekend. In ieder geval zal vroegtijdige detectie van kanker kunnen bijdragen aan de effectiviteit van DLI, met name voor de snel groeiende leukemieën.

Essentieel voor een antitumor effect zijn de alloreactieve immuuncellen afkomstig van de donor. Deze T-cellen of NK-cellen zijn in staat om specifieke antigenen te herkennen en kwaadaardige cellen op te ruimen. Het onderscheid tussen gezond en kwaadaardig weefsel is hierbij cruciaal, immers wanneer de immuuncellen reageren op gezond weefsel kan dit in fatale GVHZ resulteren. Verschillende targets voor immunotherapie zijn reeds geïdentificeerd, maar onderzoek naar nieuwe targets is nog in volle gang. Recentelijk zijn er 4 nieuwe MHag's beschreven die als target kunnen dienen voor antitumor immuniteit (Stumpf *et al*, 2009). Onder proinflammatoire omstandigheden kunnen de CD4+ T-cellen, die deze MHag's herkennen, leiden tot de ontwikkeling van GVHZ. Hoge levels van proinflammatoire cytokines kunnen een gevolg zijn van de aanwezigheid van pathogenen kort na transplantatie (Stumpf *et al*, 2009). Dit heeft een verminderd GVL effect tot gevolg. Toediening van immuunsuppressieve medicatie na transplantatie vergroot het risico op een infectieziekte, maar is voornamelijk nodig om een afstotingsreactie van het transplantaat te voorkomen. Het gebruik van MHag's wordt extra bemoeilijkt door het feit dat veel antigenen niet alleen door de tumorcel tot expressie worden gebracht. Een andere manier om specifieke lymfocyten te verkrijgen is door ze specifiek te maken, namelijk door de genoverdracht van een relevant T-cel receptor gen, waarvan de specificiteit bekend is, naar een T-cel populatie (Ringden *et al*, 2009). De eerste klinische trials zijn al uitgevoerd met positieve resultaten (Ciceri *et al*, 2009). Het gebruik van deze 'suicide genes' is dan ook veelbelovend en zal mogelijk leiden tot een meer efficiënte therapie tegen kanker. Een alternatief voor de tumorspecifieke antigenen zijn de orgaan specifieke antigenen die in onderzoek al succesvol zijn toegepast bij tumoren in niet vitale organen (Ringden *et al*, 2009). De behandeling van kanker in niet vitale organen met behulp van orgaan specifieke antigenen zou dan ook in overweging kunnen worden genomen. Het gebruik van orgaan specifieke antigenen van vitale organen is niet aan de orde, de schade die hierdoor veroorzaakt zou worden is veel te groot. Een laatste groep van antigenen die als doelwit kunnen dienen om een GVK effect uit te lokken zijn de tumor geassocieerde antigenen die selectief tot overexpressie worden gebracht op kwaadaardige cellen. Tumor geassocieerde antigenen kunnen ook gebruikt worden voor tumor-targeting. Bij radioimmunotherapie wordt er een radionuclide gebonden aan een monoklonaal antilichaam specifiek voor de tumor geassocieerde antigenen. Hierdoor wordt een letale dosis radiatie direct in de tumor afgeleverd, waardoor de schade voor de omliggende cellen beperkt blijft. Dit wordt al succesvol toegepast bij lymfoïde kanker wat hier erg gevoelig voor blijkt te zijn, zelfs als er een resistentie voor chemotherapie bestaat.

Het meeste onderzoek naar HSCT en DLI als vorm van immunotherapie heeft zich gericht op leukemie. Echter, ook solide tumoren kunnen gevoelig zijn voor deze vorm van therapie. Niercelcarcinomen zijn tot nu toe het meest onderzocht met positieve resultaten. Complete regressie van een niercelcarcinoom werd waargenomen na DLI. Onderzoek naar andere vormen van solide tumoren is ook al beschreven, maar onze kennis op dit gebied blijft achter op die van de leukemie en het onderzoek zou zich hier verder in kunnen verdiepen.

Deze scriptie heeft een beeld willen schetsen van de werking van HSCT als immunomodulerende therapie. Veel onderzoek heeft zich gericht op de associatie tussen de GVHZ en het GVL effect. Een

uitdaging in het onderzoek naar HSCT voor de behandeling van leukemie en andere vormen van kanker is het voorkomen van de GVHZ zonder dat het GVK effect verloren gaat. De hoofdvraag waar deze scriptie antwoord op heeft willen geven is: Hoe kun je optimaal gebruik maken van het graft-versus-kanker effect terwijl tegelijkertijd de graft-versus-host-ziekte zoveel mogelijk wordt voorkomen?

Een eenduidig antwoord is hier niet op te geven. Het onderzoek naar het GVK effect kent vele invalshoeken, waarvan enkele van de voornaamste hier zijn beschreven. In sommige onderzoeken wordt gepleit voor stamceltransplantatie zonder immuunsuppressie om zo optimaal gebruik te maken van het GVK effect (Kolb, 2008). In de toekomst zou dit misschien een optie kunnen zijn, maar voor nu is het geven van immunosuppressiva nog noodzakelijk. Nieuwe methoden die zich richten op het voorkomen van de GVHZ zullen gekoppeld moeten worden aan methoden om het GVK effect te promoten. Verder kan kennis over de immuuncellen van de donor helpen bij de behandeling van patiënten met zowel hematologische aandoening als voor andere tumoren. Door deze kennis zou het mogelijk moeten zijn om donoren te kiezen niet alleen op basis van de optimale histocompatibiliteit, maar ook op basis van een geschikt lymfocyten repertoire.

4. Referenties

- Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE. 1956. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J* 32:626-627.
- Bierman PJ, Sweetenham JW, Loberiza FR Jr, Taghipour G, Lazarus HM, Rizzo JD, Schmitz N, van Besien K, Vose JM, Horowitz M, Goldstone A. Syngeneic hematopoietic stem-cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma: a comparison with allogenic and autologous transplantation - Lymphoma Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry and the European Group for Blood and Marrow Transplantation. 2003. *J Clin Oncol* 21:3744-3753.
- Childs R, Chernoff A, Contentin N, Bahceci E, Schrupp D, Leitman S, Read EJ, Tisdale J, Dunbar C, Linehan WM, Young NS, Barrett AJ. 2000. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after non-myeloblastic allogeneic peripheral-blood stemcell transplantation. *N Engl J Med* 343:750-758.
- Ciceri F, Bonini C, Stanghellini MTL, Bondanza A, Traversari C, Salomoni M, Turchetto L, Colombi S, Bernardi M, Peccatori J, Pescarollo A, Servida P, Magnani Z, Perna SK, Valtolina V, Crippa F, Callegaro L, Spoldi E, Crocchiolo R, Fleischhauer K, Ponzoni M, Vago L, Rossini S, Santoro A, Todisco E, Apperley J, Olavarria E, Slavin S, Weissinger EM, Ganser A, Stadler M, Yannaki E, Fassas A, Anagnostopoulos A, Bregni M, Stampino CG, Paolo Bruzzi P, Bordignon C. 2009. Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study. *Lancet Oncol* 10:489-500.
- Cobbold M, Khan N, Pourgheysari B, Tauro S, McDonald D, Osman H, Assenmacher M, Billingham L, Steward C, Crawley C, Olavarria E, Goldman J, Chakraverty R, Mahendra P, Craddock C, Moss PA. 2005. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med* 202:379-386.
- Collins RH Jr, Shpilberg O, Drobyski WR, Porter DL, Giral S, Champlin R, Goodman SA, Wolff SN, Hu W, Verfaillie C, List A, Dalton W, Ognoskie N, Chetrit A, Antin JH, Nemunaitis J. 1997. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 15:433-444.
- Falkenburg JHF, Wafelman AR, Joosten P, Smit WM, van Bergen CA, Bongaerts R, Lurvink E, van der Hoorn M, Kluck P, Landegent JE, Kluin-Nelemans HC, Febbe WE, Willemze R. 1999. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 94:1201-1208.
- Falkenburg JHF, Marijt WAF, Heemskerk MHM, Willemze R. 2002. Minor histocompatibility antigens as targets of graft-versus-leukemia reactions. *Curr Opin Hematol* 9:497-502.
- Goulmy E. 2006. Minor histocompatibility antigens: from transplantation problems to therapy of cancer. *Human Immunol* 67:433-438.
- Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, Heim M, Wilmanns W. 1990. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 76:2462-2465.
- Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermueller J, de Witte T, Holler E, Ansari H. 1995. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 86:2041-2050.
- Kolb HJ. 2008. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* 112:4371-4383.
- Nijmeijer BA, Willemze R, Falkenburg JH. 2002. An animal model for human cellular immunotherapy: specific eradication of human acute lymphoblastic leukemia by cytotoxic T lymphocytes in NOD/scid mice. *Blood* 100:654-660.
- Oka Y, Tsuboi A, Fujiki F, Shirakata T, Nisida S, Hosen N, Nakajima H, Li Z, Oji Y, Sugiyama H. 2008. "Cancer antigen WTa protein-derived peptide"-based treatment of cancer – toward the further development. *Curr Med Chem* 15:3052-3061.

- Reddy P, Ferrara JL. 2003. Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Blood* 17:187-194.
- Ringden O, Karlsson H, Olsson R, Omazic B, Uhlin M. 2009. The allogeneic graft-versus-cancer effect. *Br J Haematol* 147:614-633.
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. 2002. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295:2097-2100.
- Stumpf AN, van der Meijden ED, van Bergen CAM, Willemze R, Falkenburg JHF, Griffioen M. 2009. Identification of 4 new HLA-DR-restricted minor histocompatibility antigens as hematopoietic targets in antitumor immunity. *Blood* 114:3684-3692.
- Yu J, Venstrom JM, Liu XR, Pring J, Hasan RS, O'Reilly RJ, Hsu KC. 2009. Breaking tolerance to self, circulating natural killer cells expressing inhibitory KIR for non-self HLA exhibit effector function after T cell-depleted allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 113:3875-3884.