

University of Groningen

Targeting breast cancer cells and their microenvironment

Nienhuis, Hilje Harmina

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2019

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Nienhuis, H. H. (2019). *Targeting breast cancer cells and their microenvironment: Pre-clinical models and translational studies*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

CHAPTER 8

Nederlandse samenvatting
(Dutch summary)

NEDERLANDSE SAMENVATTING (Dutch summary)

Borstkanker is wereldwijd de belangrijkste doodsoorzaak door kanker onder vrouwen. Deze ziekte komt veel minder voor bij mannen. Naast chirurgie en radiotherapie is systeemtherapie ook vaak onderdeel van de behandeling. De gebruikelijke medicamenteuze behandeling voor borstkankerpatiënten bestaat op geleide van eigenschappen van de tumor uit chemotherapie, hormoonbehandeling en een behandeling met geneesmiddelen gericht tegen specifieke moleculen in of op de tumorcellen. Het wordt echter steeds duidelijker dat de omgeving van de tumorcellen met daarin tevens normale cellen ook een belangrijke rol speelt in de ontwikkeling en behandeling van (borst)kanker. De 'omgeving van de tumorcellen' wordt 'tumormicro-omgeving' genoemd, en deze bestaat uit niet-kankercellen, de extracellulaire matrix (macromoleculen die de vaste structuur vormen), en signaalstoffen. De interactie tussen de tumorcellen en de tumormicro-omgeving heeft invloed op de groei, migratie en gevoeligheid voor behandelingen. De samenstelling van de tumormicro-omgeving is afhankelijk van het weefseltype waarin de tumor zit en zodoende kunnen er in verschillende weefsels verschillende signalen worden afgegeven aan de tumorcellen.

Het doel van dit proefschrift is om de invloed van de tumormicro-omgeving op borstkankercellen verder in kaart te brengen en strategieën te beschrijven waarin de tumormicro-omgeving wordt benut om borstkankercellen te bestrijden. We bestuderen hiervoor, naast preklinische modellen, ook de samenstelling van tumoren van patiënten met immunohistochemisch onderzoek en de expressie van de oestrogeenreceptor (ER) in patiënten met borstkanker.

8

Hoofdstuk 1 betreft een algemene introductie en overzicht van de hoofdstukken in het proefschrift. In **hoofdstuk 2** wordt een overzicht gegeven van de relevante factoren die een rol spelen in de micro-omgeving van borstkanker. We onderscheiden hierbij zes processen die bepalend zijn voor de groei van een tumor in een specifieke micro-omgeving te weten 1) het voorbereiden van een niche voor een metastase (uitzaaiing), 2) bevordering van tumorgroei door stimulatie van de energiehuishouding (metabole stimulatie), 3) bevorderen van verplaatsing van tumorcellen (migratie), 4) verandering van de natuurlijke afweer tegen tumorcellen (immuunmodulatie), 5) vaatnieuwvorming en 6) aanpassingen in de niet- cellulaire micro-omgeving, de extra cellulaire matrix (remodellering). Het aantal therapieën dat aangrijpt op belangrijke signaalstoffen in deze processen neemt snel toe, en daarmee de informatie uit klinische studies. Daarom beschrijven we de huidige behandelingen en ook methodes om de tumorrespons op behandelingen te voorspellen. Studies hebben al laten zien dat behandelingen gericht op 'het voorbereiden van een niche voor een metastase' en 'metabole stimulatie' succesvol kunnen zijn. Op dit moment wordt er veel onderzoek verricht naar manieren om te interveniëren in tumorcelmigratie en immuunmodulatie. Behandeling gericht tegen vaatnieuwvorming of gericht op het remodelleren van de extra cellulaire matrix blijken tot nu toe niet tot nauwelijks bij te dragen aan een anti-tumoreffect in patiënten. Voor verdere

optimalisatie van de behandeling van borstkankerpatiënten door middel van therapieën gericht op factoren in de micro-omgeving, zal zowel nader onderzoek moeten volgen naar het effect van de therapieën zelf als naar manieren om de tumorrespons op de verschillende behandelingen te voorspellen.

Concluderend vormt het richten van een behandeling op de tumormicro-omgeving een opkomende tak van onderzoek. Optimalisatie van deze benadering is noodzakelijk om de behandeling van borstkanker te verbeteren.

Histologisch is er een aanzienlijk verschil tussen de mannelijke en vrouwelijke borst. Dit betekent dat ook de micro-omgeving van een borstkanker bij een man en een vrouw verschillend is. Het is daarom goed denkbaar dat de tumormicro-omgeving de kankercellen in de mannelijke en vrouwelijke borst anders beïnvloedt. Om de mannelijke borstkankermicro-omgeving te karakteriseren wordt in **hoofdstuk 3** gekeken naar de expressie van immunologische factoren door middel van immunohistochemisch onderzoek. In het borstkankerweefsel van 847 mannelijke patiënten is de aanwezigheid bepaald van drie factoren die een rol spelen in mogelijke immuunmodulatie in de tumormicro-omgeving, namelijk de eiwitten program cell death (PD)-1 en program cell death ligand (PDL)-1 en tumorinfiltrerende lymfocyten (TILs), die behoren tot een subtype van witte bloedcellen. De aanwezigheid van TILs was vergelijkbaar tussen mannen en vrouwen. Er werd minder PD-L1 expressie gezien in tumoren van mannen dan vrouwen (13,2% versus 18,5%) PD-1 expressie was extreem zeldzaam in mannen (0,4%) en was laag in vrouwen (4,8%). Er was zowel bij mannen als bij vrouwen een sterke correlatie tussen TIL-score, PD-L1 en PD-1 expressie. Een hogere TIL score was bij mannen gecorreleerd met lymfkliermetastasen. PD-L1 expressie liet deze relatie ook zien en was ook gecorreleerd aan hogere tumorgraad. Daarnaast kwam afwezigheid van ER minder vaak voor in tumoren van mannen met borstkanker (9%) dan in tumoren van vrouwen (24%). Deze ER afwezigheid was gerelateerd aan hogere PD-L1 expressie door tumorcellen in zowel tumoren van mannelijke als vrouwelijke patiënten. De immuunomgeving lijkt daarom meer te worden beïnvloed door tumoreigenschappen dan door omgevingseigenschappen, zoals sekse van de patiënt.

Data uit eerdere onderzoeken suggereren dat het bisfosfonaat medicijn zoledroninezuur een anti-borstkankereffect heeft door een interactie met de tumor micro-omgeving. In **hoofdstuk 4** hebben we nader onderzoek gedaan naar het mechanisme verantwoordelijk hiervoor. Borstkankercellen werden afzonderlijk en samen gekweekt met stromacellen uit de tumormicro-omgeving. Door middel van fluorescentiemicroscopie en flowcytometrie analyse kunnen de kankercellen en de stromacellen van elkaar worden onderscheiden, en op die manier kon worden gedifferentieerd tussen inductie van kankerceldood met zoledroninezuur in de aan- en afwezigheid van stromacellen. Alleen in de aanwezigheid van stromacellen zorgde zoledroninezuur voor tumorceldood. Dit effect kon worden tegengegaan door het toevoegen van het eiwit transforming growth factor (TGF)- β . Vervolgens hebben we deze proefopstelling herhaald in bevruchte kippeneieren. Deze eieren bevatten een vaatrijk membraan, het

choriollantoische membraan (CAM), waarop tumorcellen kunnen groeien als een organoïde met of zonder stromacellen waarin ook vaatnieuwvorming optreedt en interactie met de micro-omgeving zich voltrekt. Ook in dit model zagen we dat zoledroninezuur alleen in de aanwezigheid van stromacellen leidde tot tumorcel dood. Door incubatie met zoledroninezuur nam de uitscheiding van TGF- β af in celkweken van alleen stromacellen en van stroma- samen met tumorcellen, maar niet in kweken van alleen tumorcellen. Wel werd in borstkankercellen een verminderde activiteit van eiwitten in de TGF- β receptorsignaalroute gevonden als deze werden geïncubeerd met kweekmedium van stromacellen behandeld met zoledroninezuur, vergeleken met kweekmedium van niet behandelde stromacellen. Dit betekent dat zoledroninezuur een anti-borstkankereffect heeft via de stromacellen in de micro-omgeving en dat dit gepaard gaat met verminderde afgifte van TGF- β door stromacellen en verminderde TGF- β receptorsignaalroute activatie in borstkankercellen.

Moleculaire beeldvorming kan 'real time' informatie geven over de interactie tussen de tumor en de tumormicro-omgeving in levende modellen en patiënten. Met moleculaire beeldvorming kan bijvoorbeeld een radioactief of fluorescent gelabelde tracer gekoppeld aan een stof gericht tegen een tumoreiwit in beeld worden gebracht met PET of fluorescentie-scan. Mogelijk kan het CAM model, de bevruchte kippeneieren, ook worden gebruikt als proefopstelling voor onderzoek met moleculaire beeldvormingstechnieken. De eieren kunnen namelijk uit de schaal (*ex ovo*) worden gehaald en in een kweekbakje verder groeien zodat de hele membraan kan worden bekeken. In het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 5** werd bestudeerd of fluorescent gelabelde antilichamen (tracers) kunnen worden geïnjecteerd in de kleine bloedvaten van de CAM en of de opname van deze tracers door middel van scans kan worden gevisualiseerd in tumoren die al eerder op de CAM waren aangebracht. Als negatieve controle werd gebruik gemaakt van tumorcellen die het doeleiwit van de tracer niet tot expressie brengen en een specifieke tracer. Met een fluorescentiescan (IVIS) konden we tumoropname ten opzichte van de negatieve controles van zowel epidermale groeifactorreceptor (EGFR) en humane epidermale groeifactorreceptor (HER)2 visualiseren. Deze studie toont aan dat het haalbaar is om het *ex ovo* CAM model preklinisch te gebruiken voor moleculaire beeldvorming.

Zoals eerder genoemd, verschillen de signalen vanuit de tumormicro-omgeving per orgaan. Dat zorgt er waarschijnlijk voor dat kankersoorten een voorkeur hebben om te metastaseren naar specifieke organen. In borstkanker zegt de aan- of afwezigheid van de ER veel over het karakter van het type borstkanker. Er is weinig informatie beschikbaar over de verschillen in ER aanwezigheid tussen metastasen in verschillende organen en de ER-expressie in normale weefsels. De expressie van ER kan worden gevisualiseerd met gelabeld oestradiol, 16α -[^{18}F]-fluoro- 17β -estradiol (^{18}F -FES) en PET scans. **Hoofdstuk 6** had als doel om de heterogeniteit van ER-tumorexpressie en de relatie van de ER-tumorexpressie met de expressie in de omliggende weefsels in kaart te brengen in patiënten met gemetastaseerde borstkanker. We hebben hiervoor ^{18}F -FES-PET en (computer tomografie) CT scans van 91 patiënten geanalyseerd. ^{18}F -FES opname wordt uitgedrukt in gestandaardiseerde opname waarde (SUV_{max}). In totaal waren 1617 laesies bestaande uit de primaire tumor of metastasen zichtbaar op ^{18}F -FES-PET scan (56,6%), CT-scan

(11,1%) of beide scans (32,2%). Laesies werden gezien in bot (78%), lymfeklieren (15%), longen (4%) en lever (2%). De gemiddelde opname van ^{18}F -FES verschilde per patiënt (SUV_{max} tussen 0.54-14.21). ^{18}F -FES opname was hoger in botmetastasen dan in lymfeklier- en longmetastasen. Ook de achtergrondsignalen in normale weefsels waren verschillend (SUV_{max} tussen 0,7-3,3). In normaal weefsel werd de hoogste ^{18}F -FES opname gezien in het skelet. Op basis van deze gegevens concluderen we dat ^{18}F -FES opname heterogeen is in zowel tumor- als normaal weefsel en dat de tumoropname wordt beïnvloed door de locatie van metastase.

