Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://dare.uva.nl/document/175626

File ID	175626
Filename	Samenvatting

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):

Type	Dissertation
Title	Vitiligo pathogenesis and immunotherapy of melanoma
Author	J.G. van den Boorn
Faculty	Faculty of Medicine
Year	2010
Pages	182
ISBN	978-94-90371-22-7

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://dare.uva.nl/record/341596

Copyright

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), other then for strictly personal, individual use.

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (http://dare.uva.nl)

SAMENVATTING

Melanoom is een kanker van de pigment cel, de melanocyt. Terwijl gelokaliseerde melanoom chirurgisch goed te behandelen is, metastaseert deze kanker betrekkelijk snel naar andere plekken in het lichaam. Gemetastaseerd melanoom is zeer slecht te behandelen middels standaard therapieën zoals bestraling of chemotherapie. Daarmee is de lange-termijn prognose voor patiënten met gemetastaseerd melanoom zeer ongunstig. Desalniettemin is melanoom een immunogene tumor, en daarmee zouden melanoom patiënten baat kunnen hebben bij immuuntherapie. De immunogeniciteit van melanoom wordt geïllustreerd door de observaties dat melanoom antigeen-specifieke T cellen vaak in het bloed van melanoom patiënten gevonden worden, en dat infiltratie van de tumor door deze T cellen gepaard gaat met een verbeterde prognose. Daarnaast, gaat bij ongeveer 9% van de patiënten met gemetastaseerd melanoom de primaire laesie in spontane regressie. Dankzij deze immunogeniciteit worden autoimmuun neven-effecten vaak waargenomen tijdens melanoom immuuntherapie, voornamelijk vitiligo. Terwijl melanoom een kanker van de melanocyt is, verdwijnen bij vitiligo juist de melanocyten uit de huid. Het ontwikkelen van vitiligo tijdens het ondergaan van melanoom immuntherapie is geassocieerd met een superieure prognose, en wordt gezien als het resultaat van een actieve T cel-gemedieerde autoimmuun respons gericht tegen de melanocyt differentiatie antigenen welke tot expressie worden gebracht door zowel melanocyten als melanoom cellen.

Gebaseerd op deze klinische observatie, heeft het werk beschreven in deze dissertatie tot doel het ontwikkelen van een effectieve melanoom immuuntherapie gebaseerd op de directe inductie van vitiligo. Hierbij hebben we als eerste de actieve rol van perilesionale T cellen gedefinieerd in de progressieve destructie van melanocyten in de vitiligo huid. Met het doel actief vitiligo te induceren bij melanoom, en de huid-blekende stof monobenzon zijnde een sterke initiator van vitiligo, hebben wij hierna onderzocht welk immunologisch mechanisme ten grondslag ligt aan de inductie van T cel-gemedieerde autoimmuniteit tegen gepigmenteerde cellen door deze stof. Uiteindelijk hebben we een effectieve melanoom immuuntherapie ontwikkeld op basis van monobenzon, in het B16-B6 muismodel voor maligne melanoom.

Bevindingen

Een effectieve immuun respons tegen binnendringende micro-organismen of maligne cellen is het resultaat van de intieme interacties tussen verschillende celtypen van het immuunsysteem. In hoofdstuk 1 bespreken we hoe een effectieve immuun respons wordt opgebouwd, en hoe afwijkingen in dit proces autoimmuniteit kunnen veroorzaken. Terwijl autoimmuniteit vaak wordt gezien als schadelijk voor het eigen lichaam, is kanker immuuntherapie afhankelijk van gerichte autoimmuniteit tegen de lichaamseigen kwaadaardige weefsels. De mogelijkheden en obstakels voor het induceren van een dergelijke respons worden besproken, en de immunologische mogelijkheden omtrent vitiligo en melanoom worden uitgelicht. In het bijzonder wordt aandacht geschonken aan het actief induceren van vitiligo middels de huid-blekende

stof monobenzon als een immuuntherapie voor melanoom. In deze context wordt de huidige immunologische kennis betreffende monobenzon besproken.

Effectieve anti-tumor immuniteit wordt vaak belemmerd door de zelf-tolerantie aanwezig in de circulerende T cel populatie. Om destructie van kankercellen teweeg te brengen, zal iedere immuuntherapie deze tolerantie moeten doorbreken. Echter, dit proces moet gedoseerd en gericht plaatsvinden om te voorkomen dat wijdverspreide autoimmuniteit ontstaat gericht tegen uiteenlopende weefsels. Er bestaat een fijne balans tussen zelf-tolerantie en autoimmuniteit, welke voornamelijk geregeld wordt door centrale en perifere selectie mechanismen welke het reactiviteitspatroon van perifere T cellen vorm geven. Door de recente literatuur te bespreken, laat hoofdstuk 2 zien dat deze selectie mechanismen echter niet zo strikt zijn als wordt verondersteld door de klassieke aanname van het "een T cell-een antigeen" dogma. In tegendeel, de antigeen-reactiviteit van T cellen hangt af van antigeen kruis-reactiviteit en aviditeits tuning, wat ertoe leidt dat er een flexibele balans bestaat tussen zelf-tolerantie en autoimmuniteit. Deze kennis zou in ogenschouw moeten worden genomen bij het ontwerpen van meer effectieve anti-tumor immuuntherapieën in de toekomst.

Autoimmuun ziekten zijn aandoeningen waarbij de balans tussen zelf-tolerantie en –autoimmuniteit in het voordeel van de autoimmuniteit is uitgevallen. Vitiligo is lang gedacht veroorzaakt te worden door autoimmuun T cellen. In hoofdstuk 3 correleren we de infiltratie van autoreactieve CD8+ T cellen in de perilesionale vitiligo huid direct aan lokale melanocyt destructie, gebruik makende van een autoloog huid explant model. CD8+ T cellen verkregen uit perilesionale vitiligo huid biopten, waren in specificiteit verrijkt voor het herkennen van melanocyt differentiatie antigenen en konden in vitro geactiveerd worden door middel van stimulatie met deze antigenen. Bovendien konden deze T cellen autologe, normaal gepigmenteerde, huid explants infiltreren alwaar zij in de huidstructuur zelf cytotoxische destructie van melanocyten teweeg brachten. Onze bevindingen laten zien dat bij vitiligo melanocyt antigeen-specifieke T cellen de melanocyten in de huid vernietigen. Daarmee leveren we bewijs voor gerichte autoimmuun weefsel-destructie bij vitiligo, waardoor de karakteristieke witte huidvlekken ontstaan. Deze resultaten geven een sterke impuls aan de gedachte om deze vitiligo-geassocieerde T cellen, welke de differentiatie antigenen herkennen die gedeeld tot expressie worden gebracht door zowel melanocyten als melanoom cellen, te gebruiken in melanoom immuuntherapie.

De gedachte om vitiligo-geassocieerde T cellen tegen melanoom te gebruiken wordt verder versterkt door de observatie dat T cellen aanwezig in de perilesionale vitiligo huid een verhoogde reactiviteit vertonen tegen deze gedeelde melanocyt differentiatie antigenen, in vergelijking met de T cellen die gevonden worden in melanomen. Aan de hand van de huidige literatuur bespreekt hoofdstuk 4 de mogelijkheid om vitiligo-geassocieerde T cellen of hun T cel receptoren te gebruiken bij melanoom immuuntherapie.

Omdat vitiligo ontwikkeling tijdens melanoom immuuntherapie wijst op gerichte T cel-gemedieerde autoimmuniteit tegen gepigmenteerde cellen, zou het zeer gunstig

kunnen zijn om actief vitiligo op te wekken bij melanoom patiënten. Om vitiligo te induceren worden vaak topicale huid-blekende stoffen toegepast, de sterkste hiervan is monobenzon. In hoofdstuk 5 bestuderen we de vraag hoe de huid-blekende stof monobenzon progressieve autoimmuun vitiligo veroorzaakt. We laten hier zien dat monobenzon de immunogeniciteit van gepigmenteerde cellen verhoogd. In het bijzonder tonen we aan dat wanneer monobenzon door tyrosinase enzymatisch werd omgezet, zich quinon-haptenen vormden aan cysteïne-residuen in tyrosinase. Daarnaast laten we zien dat de conversie van monobenzon door tyrosinase gepaard ging met het genereren van reactieve zuurstof radicalen, en dat daarnaast tyrosinase- en MART-1-bevattende exosomen werden losgelaten door blootgestelde gepigmenteerde cellen. Door gebruik te maken van autologe DC-T cel stimulaties, demonstreren we bovendien dat monobenzon-blootgestelde gepigmenteerde cellen DCs kunnen activeren en dat zij binnen 7 dagen in vitro een sterke melanoom-reactieve CD8+ T cel respons kunnen opwekken. Van de CD8+ T cel klonen geïsoleerd uit deze stimulaties, was 78% in staat zowel monobenzon-blootgestelde als niet blootgestelde melanoom cellen te herkennen. Gezamenlijk laten deze resultaten zien dat door de specifieke effecten van monobenzon op tyrosinase, monobenzon CD8+ T cel immuniteit tegen de specifieke zelf-antigenen van melanocyten en melanoom cellen kan opwekken. Dit maakt monobenzon tot een krachtig nieuw immuuntherapeutisch middel tegen melanoom

In hoofdstuk 6 gaan we dieper in op de directe effecten van monobenzon op de gepigmenteerde cel, om zo een mechanistische basis te vormen aangaande de verhoogde immunogeniciteit van de pigmentcellen zoals we die hebben gezien in hoofdstuk 5. Door middel van electronen microscopie laten we zien dat monobenzon autofagie van het melanosoom induceerde in melanoom cellen. Daarnaast, middels confocale laser scanning microscopie experimenten met melanocyten en melanoom cellen, demonstreren we dat deze autofagie een lysosomale afbraak route vertegenwoordigd welke leidt tot het dirigeren van tyrosinase naar het MHC klasse-II compartiment. Monobenzon blootgestelde melanoom cellen vertoonden bovendien ook ubiquitinatie van tyrosinase. Tezamen kunnen deze twee processen leiden tot de verhoogde presentatie van melanosoom-specifieke antigenen in MHC klasse-I en –II. Gezien monobenzon behandelde gepigmenteerde cellen constant verwikkeld zijn in het afbreken-, verwerken-, en presenteren van melanosoom eiwitten via autofagie en ubiquitinatie, vormen de resultaten van dit hoofdstuk de meest waarschijnlijke verklaring voor de verhoogde immunogeniciteit van monobenzon-blootgestelde gepigmenteerde cellen.

Uiteindelijk, door de bevindingen uit de eerdere hoofdstukken te combineren, is er een nieuwe effectieve melanoom immuuntherapie ontwikkeld in hoofdstuk 7, gebaseerd op topicale monobenzon applicatie. Hierbij is gebruik gemaakt van het B16-B6 model voor maligne melanoom bij de muis. We hebben de vitiligo-inducerende werking van monobenzon gecombineerd met de immuunstimulerende effecten van de adjuvants CpG en imiquimod, gezamenlijk als MIC-immuuntherapie. Deze aanpak

belette de groei van B16.F10 melanoom tijdens therapie in 85% van de C57BL/6 wildtype muizen, en induceerde een tumor-vrije overleving van meer dan 100 dagen in gemiddeld 60% van de muizen. De MIC-therapie induceerde ook een sterke anti-melanoom immuun respons, gekenmerkt door de activatie van melanoom antigeen-specifieke CD8+ T cellen, melanoom-reactieve NK cellen en het initiëren van een melanoom-reactieve IgG respons. Daarnaast bracht de MIC therapie beschermende immuniteit teweeg, welke 165 dagen na het stoppen van de behandeling melanoom uitgroei sterk wist te onderdrukken, wanneer de tumor opnieuw werd ingespoten. De simpel te gebruiken MIC therapie vertegenwoordigd daarmee een effectieve en goedkope therapie, welke direct toepasbaar is in de kliniek. Bovendien laat de MIC therapie zien dat de actieve inductie van vitiligo door middel van monobenzon een effectieve immuuntherapeutische aanpak is tegen melanoom.

Hoofdstuk 8 integreert de moleculaire-, in vitro- en in vivo bevindingen uit de individuele hoofdstukken in een centrale 'integratie theorie' betreffende monobenzon-geïnduceerde vitiligo. Bovendien wordt deze integratie theorie besproken in het licht van de huidige kennis en literatuur, en worden de mogelijkheden en obstakels voor toekomstige melanoom immuuntherapie geïnterpreteerd.