Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://dare.uva.nl/document/74450

File ID	74450
Filename	10 Samenvatting en conclusies

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):

Type	Dissertation
Title	Interactions of BCG with urothelial tumor cells in immunotherapy for superficial bladder cancer
Author	R.F.M. Bevers
Faculty	Faculty of Medicine
Year	2004
Pages	126
ISBN	9090178619

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://dare.uva.nl/record/202942

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)

10 Samenvatting en conclusies

Hoofdstuk 1: Introductie.

In Nederland wordt elk jaar bij 2500 patiënten de diagnose blaastumor gesteld. Veelal betreft het een oppervlakkige vorm van blaaskanker, die met locale resectie (TUR) kan worden behandeld. Omdat patiënten met oppervlakkige blaastumoren een hoge recidief kans (60-70 %) hebben, wordt na een TUR vaak een nabehandeling gegeven. Deze nabehandeling bestaat uit blaasspoelingen met chemotherapeutica dan wel immunomodulatoren. Van deze stoffen is bacillus Calmette-Guérin (BCG) in het merendeel van de uitgevoerde klinisch studies het meest effectief gebleken. BCG is een verzwakte runder tuberculose bacterie, die oorspronkelijk als vaccin tegen tuberculose werd ontwikkeld. De toepassing van een levende bacterie in de blaas kan echter ook tot bijwerkingen en hiermee geassocieerde risico's leiden. Deze bijwerkingen kunnen variëren van een frequent voorkomende, hinderlijke cystitis tot zeldzame, maar levensbedreigende, aandoeningen zoals een BCG sepsis.

Sinds BCG in 1976 voor het eerst klinisch werd toegepast tegen oppervlakkige blaastumoren is er veel onderzoek naar werkingsmechanisme van de anti-tumor activiteit van BCG verricht. Het precieze werkingsmechanisme van BCG, als immunotherapie, is evenwel nog niet ontrafeld, al worden de contouren van deze puzzel wel steeds duidelijker. Bekend is dat BCG een immuunreactie oproept, die onder andere tot uiting komt in een lymfocytair infiltraat in de blaaswand. In de urine van met BCG behandelde patiënten wordt een indrukwekkend aantal cytokinen aangetroffen, zoals interleukine (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, tumor necrosis factor (TNF)-α and interferon (IFN)-γ. Naar alle waarschijnlijkheid vormen lymfocyten en macrofagen de belangrijkste bron van deze cytokinen, maar vooralsnog

kunnen andere celtypen, zoals urotheliale tumor cellen, niet worden uitgesloten.
In dit proefschrift worden een aantal vragen gesteld aangaande het werkingsmechanisme van BCG en de rol die blaastumorcellen hierin spelen. In de hoofdstukken 2 tot en met 7 wordt de interactie tussen BCG bacteriën, de blaaswand en urotheliale tumorcellen behandeld. In hoofdstuk 8 wordt een synthese gemaakt van de kennis over het werkingsmechanisme van BCG, ruim 25 jaar na de eerste klinische toepassing.

Hoofdstuk 2

De blaas is aan de binnenkant bekleed met een laag proteoglycanen, eiwitten met glycosaminoglycanen (GAG) als zijketens, die het oppervlak van de blaas beschermen. Met als doel de bijwerkingen van BCG te reduceren, werd toevoeging van pentosan polysulfaat (PPS), een op GAG lijkende polyelektrolyt die wordt toegepast bij de behandeling van interstitiele cystitis, bij BCG therapie overwogen. Over de invloed van PPS op de effectiviteit van de BCG behandeling bestaat evenwel geen kennis.
Het effect van PPS op de BCG-geïnduceerde immuunrepons wordt bestudeerd bij cavia's. In tegenstelling tot de verwachting leidt toevoeging van PPS, in het diermodel, tot een versterking van de BCG-geïnduceerde effecten. Na intravesicale instillatie van PPS wordt in reactie op BCG een toename van het aantal blaaswandinfiltraten, het gewicht van de iliacale lymfklieren en een versterkte huidreactie op tuberculine (PPD) waargenomen. Nader onderzoek toont dat PPS sterk bindt aan de blaaswand en een opvallende adherentie vertoont voor BCG. Bij andere micro-organismen, *Klebsiella pneumonia, S. faecalis, E.Coli en Proteus*, is een dergelijke adherentie niet waargenomen.
Geconcludeerd wordt dat PPS mogelijk als brug kan functioneren tussen BCG en de blaaswand, resulterend in toename van de binding van BCG en een versterkte stimulatie van de immuunreactie.

Hoofdstuk 3

Het wordt algemeen geaccepteerd dat het antitumor effect van BCG grotendeels is gebaseerd op een door BCG opgeroepen immuunreactie. Dit gaat gepaard met de locale productie en uitscheiding van een groot aantal cytokinen, zoals IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 en TNF-α en IFN-γ. Als cellulaire bron van deze cytokinen komen waarschijnlijk lymfocyten en macrofagen in aanmerking, die in de blaaswand infiltreren. Momenteel kunnen evenwel andere cellen niet worden uitgesloten.
In deze studie wordt onderzocht of *in vitro* gecultiveerde blaastumorcellen cytokinen produceren. De onderzochte blaastumorcellijn T24 blijkt zowel TNFα als IL-6 constitutief te

synthetiseren. In aanwezigheid van BCG wordt de cytokine synthese sterk gestimuleerd. Voor deze upregulatie is een minimum BCG incubatietijd vereist van 0,5-1 uur, overeenkomend met een in de klinische situatie toegepaste instillatieduur van 1-2 uur. Stimulatie van de cytokine synthese van T24 cellen lijkt een unieke eigenschap van (levend) BCG, daar zowel BCG-geconditioneerd medium, als andere bacteriën, zoals *E. coli* en *S. faecalis*, noch een celwandprepraat van *N. rubra* een effect hebben op de cytokine synthese van T24 cellen.
De toename van de cytokine synthese van blaastumorcellen onder invloed van BCG kan een bijdrage leveren in de geïnduceerde immuunrespons van met BCG behandelde patiënten.

Hoofdstuk 4

Het wordt verondersteld dat voor een verandering van de genexpressie van urotheliale tumorcellen internalisatie van BCG een voorwaarde is. Teneinde de interactie tussen BCG bacteriën en blaastumorcellen beter te kunnen bestuderen moeten BCG binding en fagocytose kunnen worden onderscheiden. Hiervoor zijn diverse technieken bekend, maar er bestaat behoefte aan een methodiek die voor grote aantallen cellen toepasbaar.
In dit onderzoek wordt een nieuwe, algemeen toepasbare, relatief eenvoudige methode beschreven waarmee een onderscheid kan worden gemaakt tussen adherentie en opname van bacteriën door (niet-professionele) fagocyterende cellen. Na incubatie van *in vitro* gecultiveerde eukaryotische cellen met, met fluorescein isothiocyanate (FITC), gelabelde bacteriën worden de niet gebonden bacteriën weggewassen. Vervolgens wordt een twee-stappen kleuring uitgevoerd, met eerst de voor de bacterie specifieke antilichamen en vervolgens met phycoerythrin (PE)- geconjugeerde antilichamen. Dubbelfluorescentie FACS analyse maakt nu onderscheid tussen geïnternaliseerde en slechts gebonden bacteriën. De methode is toegepast om de internalisatie van BCG door humane blaastumorcellijnen met een verschillende graad van differentiatie te bestuderen. Condities die fagocytose remmen (4 °C, cytochalasin B) dan wel blokkeren (anti-BCG antilichamen) dienen als controle. Er wordt waargenomen dat, in tegenstelling tot goed gedifferentieerde cellijnen, uitsluitend de slecht gedifferentieerde TCC cellijnen BCG internaliseren.
De nieuw ontwikkelde methode blijkt uitermate geschikt om internalisatie van bacteriën in grote aantallen levende eukaryotische cellen te bestuderen.

Hoofdstuk 5

Er bestaat geen eenduidige consensus over de rol van fibronectine (FN) in de hechting van BCG aan en fagocytose van BCG door blaastumorcellen.

De relatie tussen FN expressie en het vermogen van urotheliale tumorcellen BCG te fagocyteren is onderzocht in een aantal blaastumorcellijnen. Goed gedifferentieerde cellijnen (RT-4, SBC-2, SBC-7) vertonen noch celmembraan geassocieerde FN expressie noch fagocytose van BCG. Daarentegen tonen slecht gedifferentieerde cellijnen (T24, TCC-SUP, J82) een FN expressie op de celmembraan èn internalisatie van BCG. In blokkade experimenten blijkt echter toevoeging, van zowel anti-FN antilichamen als $F(ab)_2$ fragmenten van anti-FN antilichamen, de BCG opname niet te voorkomen. Internalisatie van BCG is echter wel te remmen met anti-BCG antilichamen.

Deze bevindingen bij *in vitro* gecultiveerde humane blaastumorcellijnen suggereren dat, BCG opname in slecht gedifferentieerde blaastumorcellen niet afhankelijk is FN en hoogstwaarschijnlijk wordt verzorgd door (additionele) mechanismen die samen met FN aanwezig zijn.

Hoofdstuk 6

IL-6 wordt, naast diverse andere cytokinen, in de urine van met BCG behandelde blaastumor patiënten gevonden. Het is aangetoond dat de constitutieve IL-6 synthese van blaastumorcellen *in vitro* door BCG aanzienlijk wordt gestimuleerd.

Deze studie relateert de IL-6 synthese van zes blaastumorcellijnen aan de graad van differentiatie en aan het vermogen om BCG intracellulair op te nemen. Goed gedifferentieerde cellijnen (RT-4, SBC-2, SBC-7) blijken vrijwel geen BCG te fagocyteren en de IL-6 synthese van deze cellijnen wordt niet beïnvloed door de aanwezigheid van BCG. Cellijnen met een hoge graad van dedifferentiatie (T24, TCC-SUP, J82) tonen in belangrijke mate de capaciteit tot BCG fagocytose. In twee van deze drie cellijnen (T24, J82) stimuleert BCG de IL-6 synthese aanzienlijk. De IL-6 productie in TCC-SUP wordt niet verder gestimuleerd door BCG, mogelijk omdat deze cellijn al een constitutief hoge IL-6 productie kent. Uit gedetailleerde experimenten met T24 cellen blijkt dat de BCG-geïnduceerde IL-6 synthese afhankelijk is van de BCG concentratie en de incubatietijd. Cytochalasine B, een fagocytose remmer, kan evenals anti-BCG antilichamen de BCG-gestimuleerde IL-6 synthese remmen. In tegenspraak met de eerder voorgestelde functie van fibronectine (FN) kunnen anti-FN antilichamen de BCG-geïnduceerde IL-6 synthese niet remmen.

De klinische observatie dat slecht gedifferentieerde blaastumoren effectiever reageren op BCG therapie geeft ruimte voor de hypothese dat

de intracellulaire opname van BCG door slecht gedifferentieerde blaastumorcellen en de hierdoor gestimuleerde IL-6 synthese van deze cellen een oorzakelijk onderdeel zijn van de anti-tumor werking van BCG.

Hoofdstuk 7

De BCG behandeling kent een aantal bijwerkingen, variërend van lichte cystitis-klachten tot ernstige BCG sepsis. Orale toediening van het tuberculostaticum isoniazide (INH), om bijwerkingen te verminderen, aan patiënten die met BCG worden behandeld, is momenteel het onderwerp van klinische studies. Aangenomen wordt dat INH niet interfereert met het anti-tumor effect van BCG, maar de beschikbare gegevens hierover zijn niet eenduidig.

In deze studie worden het effect van INH op tumorcel proliferatie en BCG-geïnduceerde IL-6 en IL-8 synthese van een serie humane blaastumorcellijnen bestudeerd. INH in toenemende, fysiologische concentratie interfereert niet met de proliferatie van de cellijnen T24, TCC-SUP en BT-B. Tevens wordt de constitutieve en BCG-geïnduceerde synthese van IL-6 en IL-8 in T24 cellen door INH niet beïnvloed.

Als blaastumorcellen een belangrijke, oorzakelijke rol spelen in de door BCG opgewekte immuunrespons, wijzen deze *in vitro* resultaten erop dat, op dit niveau, INH niet interfereert met het werkingsmechanisme van BCG en de klinische effectiviteit.

Hoofdstuk 8

Jarenlang onderzoek heeft geresulteerd in een redelijk kennis over het werkingsmechanisme van BCG bij oppervlakkige blaastumoren, al blijven er nog vele vragen onbeantwoord. Deze review geeft een overzicht van de huidige kennis.

Na instillatie van BCG in de blaas dragen de fysisch-chemische eigenschappen van de blaaswand *en* BCG organismen er toe bij dat BCG bacteriën zich dichtbij de blaaswand verzamelen. Een geringe fractie van de geïnstilleerde BCG bacteriën hecht aan, en passeert vervolgens de glycosaminoglycan (GAG) laag van de blaaswand. BCG wordt zowel door blaastumorcellen als door professionele antigeen-presenterende cellen (APC) gefagocyteerd. Na verwerking van BCG in de cel worden antigenen gepresenteerd via MHC klasse II moleculen aan $CD4^+$ T-cellen en aan $CD8^+$ T-cellen via MHC klasse I moleculen. Antigenen in de vorm van lipiden en glycolipiden kunnen, zonder gebruik te maken van de MHC klasse I en II route, worden gepresenteerd aan $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cellen via CD1. Intracellulair BCG resulteert in een veranderde gen-expressie en in secretie van bepaalde cytokinen (ook bekend als interleukinen). Chemokines zoals IL-8, deels afkomstig van tumorcellen

die BCG hebben opgenomen, dragen bij aan de locale immuunreactie en dirigeren leukocyten en mononucleaire cellen naar de blaaswand. Hierdoor ontstaat in de blaaswand de voorwaarden voor het ontstaan van een Th1 reactie of cel-bemiddelde immuunreactie, met de kenmerkende expressie van diverse cytokinen, zoals interferon [IFN]-γ, IL-2, IL-12 and tumor necrose factor [TNF]-β. Deze Th1 reactie resulteert in een "delayed type hypersensitivity" (DTH) allergische reactie en cel-bemiddelde cytotoxisch effecten. Afhankelijk van diverse factoren kan er ook, zij het in geringe mate, een Th2 reactie worden geactiveerd, geassocieerd met de productie van Il-6 en IL-10. Hierdoor kan de Th1 reactie negatief worden beïnvloed.
Door de Th1 reactie worden cytotoxische cellen gerekruteerd en geactiveerd. De natural killer (NK) cel lijkt de cruciale rol van cytotoxische effector cel te vervullen, maar momenteel kunnen andere, cytotoxische cellen niet worden uitgesloten. Het anti-tumor effect van BCG berust waarschijnlijk voor een groot deel op deze geactiveerde effector cellen die BCG-opgenomen tumorcellen aanvallen en doden. Daarnaast kunnen directe effecten van de diverse cytokinen en het BCG zelf een rol spelen.