

# Mikromiljøet som med- og modspiller i B-celle-non-Hodgkin-lymfomer

Uffe Klausen<sup>1</sup>, Mads Hald Andersen<sup>1</sup> & Lars Møller Pedersen<sup>2</sup>

## STATUSARTIKEL

1) Center for Cancer Immunoterapi, Hæmatologisk Afdeling, Herlev og Gentofte Hospital

2) Hæmatologisk Afdeling, Herlev og Gentofte Hospital

Ugeskr Læger  
2017;179:V03170220

Kræft kan ikke længere betragtes som isolerede celler på afveje, men skal ses som helhed i samspil med de celler, der udgør miljøet omkring kræftcellerne. I denne artikel vil vi redegøre for vores nuværende viden om mikromiljøets betydning for de hyppigste B-celle-non-Hodgkin-lymfomer (B-NHL), samt hvilken rolle de enkelte celletyper spiller, enten som med- eller modspillere, i kampen mod lymfekræft.

## NON-HODGKIN-LYMFOMER

NHL er en heterogen gruppe af både B- og T-cellelymfomer og dækker over mere end 35 forskellige under typer. Denne artikel omhandler B-cellelymfomerne, som udgør mere end 80% og findes i klinisk aggressive former, som diffust storcellede B-cellelymfom (DLBCL) og mere indolente typer, herunder follikulært lymfom (FL).

B-NHL behandles typisk med kemoterapi i kombination med rituximab, som er et antistof mod B-cellemarkøren CD20. Ved de aggressive lymfomer er dette ofte en kurativ behandling, men med fortsat relativ høj relapsrate. For de indolente tilstande har behandlingen ikke kurativt potentiale, hvorfor man sigter mod at holde patienten symptomfri og holde toksiciteten minimal. De prognostiske værktøjer bygger på kliniske parametre, som kun i begrænset omfang kan vejlede klinikeren i forhold til terapivalg. Der forskes derfor i at kortlægge genetiske og biologiske faktorer, som har ind-

flydelse på patogenesen, samt deres prognostiske betydning. Det er et kompliceret og uafsluttet arbejde, men man ved nu, at miljøet omkring lymfomcellerne spiller afgørende roller for lymfomets overlevelse og vækst. I modsætning hertil ved man også, at immunsystemet er i stand til at forhindre og bremse udviklingen af lymfomer, hvilket illustreres af den øgede forekomst af NHL blandt stærkt immunsupprimerede patienter [1].

## MIKROMILJØETS SAMMENSÆTNING

Immunsystemet er normalt meget fint afbalanceret mellem immunitet og tolerans, således at organismen kan bekæmpe virus og bakterier, uden at det påfører skader på normalt væv. En række forskellige immunhæmmende celletyper indgår i dette komplicerede netværk af centrale og perifere toleransmekanismer, for eksempel de såkaldte regulerende T-celler (Tregs), visse former for dendritceller (DC) og såkaldte myeloidafledte hæmmeceller (MDSC) og tumorassocierede M2-polariserede makrofager (TAM<sub>M2</sub>) (Figur 1). De immunhæmmende celler er under normale omstændigheder vigtige, men for kræftpatienter udgør de et netværk, som forhindrer et effektivt antitumorimmunrespons. For NHL har miljøet tilsyneladende forskellig betydning, og overordnet tegner der sig et mønster af, at de indolente lymfomer er mere afhængige af mikromiljøet end de aggressive NHL (Figur 2) [2].

I mikromiljøet indgår flere immunceller i lymfomagenesen, herunder dendritceller, stromaceller og follikulære T-hjælper (FTh)-celler (Figur 1A). DC aktiverer B-celleceptoren via antigenpræsentation, hvilket er et vigtigt signal for lymfomcellernes vækst og overlevelse [3]. Interleukin (IL)4 og IL21 er Th2-cytokiner, som har naturlig stimulerende effekt på B-celler og derfor også er et nærende signal for de maligne B-celler. Th2-cytokinerne udskilles af de hyppigt forekommende FTh-celler, som også stimulerer lymfomcellerne med koaktiverende signaler ved direkte cellekontakt [4]. Stromaceller er essentielle celler i lymfeknudernes arkitektur, hvor de via kemokiner dirigerer, hvilke celler der skal tiltrækkes til mikromiljøet, og hvilke roller de skal varetage. Ved mantelcellelymfom (MCL) lader stromacellerne til at spille en direkte rolle for behandlingsresistensen [5].

## HOVEDBUDSKABER

- ▶ Kræftceller har længe været anskuet som autonome celler, som uhæmmet tilsidesætter samspillet med de omgivende celler.
- ▶ Inden for det seneste årti er man nået til den erkendelse, at mikromiljøet omkring tumorcellerne indgår direkte i non-Hodgkin-lymfomers udvikling og trivsel og spiller en rolle for, hvordan kræftbehandling virker.
- ▶ Der er mange lovende lægemidler på vej til behandling af lymfekræft. Disse

lægemidler tager udgangspunkt i lymfomcellernes interaktion med omgivelserne, og særligt immunterapi tager udgangspunkt i at vende mikromiljøet mod lymfomcellerne. Forståelse af mikromiljøets indflydelse på det enkelte lægemiddel og de mange nye behandlingsmuligheder er et skridt på vejen til at skræddersy den rette behandling til den rette patient.

Maligne mutationer indebærer ofte dannelse af fremmede antigener, som immunforsvaret kan genkende. Cytotoksiske T-lymfocytter (CTL) spiller en vigtig rolle i immunsystemets angreb på tumorceller, men i NHL er de ofte ineffektive med nedsat motilitet, cytofringivelse og defekt synapsedannelse som resultat af hæmmende signaler i mikromiljøet [6]. CTL understøttes af Th-celler, *natural killer* (NK)-celler og tumorassocierede M1-makrofager ( $TAM_{M1}$ ), som led i deres naturlige immunologiske funktion (Figur 1C) [7].

På grund af immunforsvarets antitumorrespons er det nødvendigt for lymfomcellernes overlevelse, at de er i stand til at undslippe immunforsvaret. Det foregår bl.a. ved, at lymfom- og stromaceller rekrutterer immunosupprimerende  $TAM_{M2}$  og Tregs til mikromiljøet, hvilket hæmmer antitumoraktiviteten (Figur 1B) [8]. Modsat de immunaktive  $TAM_{M1}$  er  $TAM_{M2}$  associeret med immunosuppression og karnydannelse, hvilket også er påvist ved NHL [9]. Det er påvist, at stromaceller i mikromiljøet spiller en rolle i polariseringen af makrofager mod en M2-fænotype via cytokiner og kemokiner [8, 9]. Tregs er i stand til at hæmme den cytotoxiske effekt af CTL og NK-celler og er hyppigt til stede i NHL [10]. Ligesom for makrofagerne spiller stromaet og lymfomcellerne en rolle i ændring af proinflammatoriske Th-celler til antiinflammatoriske Tregs via cytokiner og kemokiner [11]. MDSC er en underetype af cirkulerende monocytter, som er fundet at have både systemiske og lokalt immunosupprimerende egenskaber i NHL og er associeret med avanceret sygdomsstadie og aggressiv sygdomspræsentation [12].

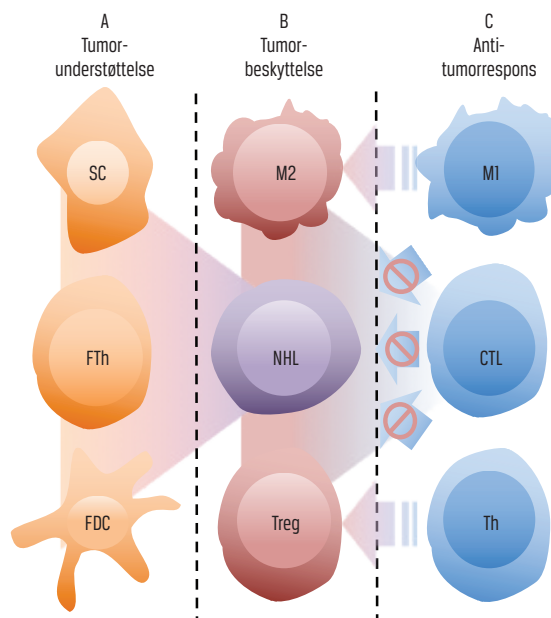
### MEKANISMER FOR IMMUNUNDRAGELSE

De mekanismer, som cellerne anvender til immununddragelse, er ofte nogle, som under normale omstændigheder modererer omfanget af et immunrespons for at beskytte værten mod unødvendig vævsskade. Mekanismerne opreguleres derfor i mikromiljøet i naturlig forlængelse af et antitumorrespons og kan udtrykkes af både raske immunceller og lymfomceller. I et fransk studie fandt man, at op mod 30 af 54 udvalgte gener, der indgår i immununddragelsesmekanismer, var overudtrykt i NHL, herunder *PD1*, *PD-L1* og *PD-L2* [13].

*Programmed death receptor 1* (PD1) er et immuncheckpoint, som findes på T-celler og hæmmer cellens immunnaktivitet, når den bindes til liganderne PD-L1 eller PD-L2. I DLBCL er PD-L1 og PD-L2 udtrykt både på tumorcellerne og i mikromiljøet, men i FL er PD-L1 næsten udelukkende udtrykt af raske celler i mikromiljøet, særligt makrofager [13]. I studier er det påvist, at PD-L2 har højere receptoraffinitet end PD-L1 og oftere er udtrykt på de maligne celler i NHL, hvilket gør PD-L2 interessant for målrettet behandling i lymfomer [13, 14]. TIM3, LAG3 og CTLA4 er andre immuncheckpoints, som er overudtrykt på T-celler i NHL og karak-

**FIGUR 1**

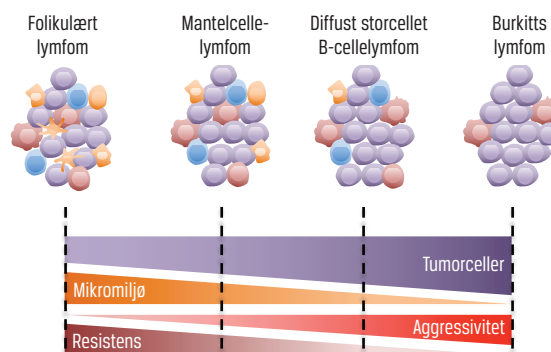
Mikromiljøets celler og deres roller. **A.** Stromaceller (SC), follikulære T-hjælperceller (FTh) og follikulære dendritceller (FDC) understøtter lymfomcellernes proliferation og overlevelse, bl.a. ved proinflammatoriske cytokiner, kostimulation og B-celleceptorsignaler. **B.** M2-makrofager (M2), regulatoriske T-celler (Treg) og lymfomceller hæmmer immunforsvarets antitumorrespons bl.a. ved at udtrykke immuncheckpoints, herunder PD-1-ligander. **C.** M1-makrofager (M1), cytotoksiske T-lymfocytter (CTL) og T-hjælperceller (Th) repræsenterer immunforsvarets antitumorrespons og fungerer ved toksisk aktivitet, cytokinudskillelse og fagocytose. Th og M1 ændres i mikromiljøet til hhv. Tregs og M2.



NHL = non-Hodgkin-lymfomcelle.

**FIGUR 2**

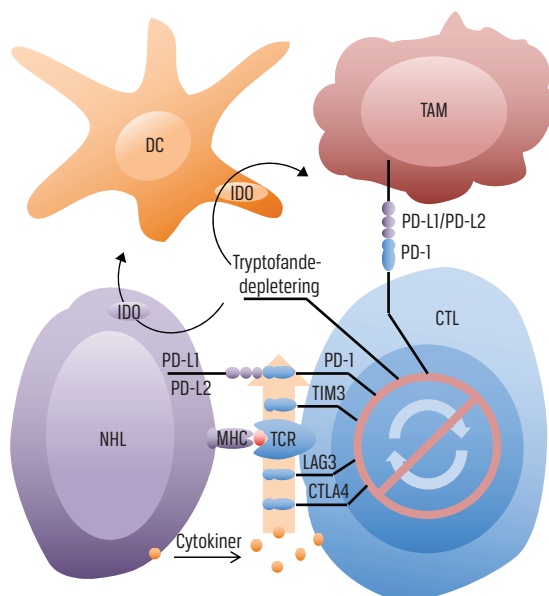
Mikromiljøets variation blandt non-Hodgkin-lymfomundertyper. Det lavmaligne follikulære lymfom og det meget aggressive Burkitts lymfom er polerne i et kontinuerligt mønster, hvor mikromiljøets diversitet og betydning aftager med lymfomets aggressivitet. Mikromiljøet har indflydelse på, hvordan behandlingen virker, og kan beskytte tumorcellerne. Dette kan være en af flere forklaringer på, at de lavproliferative lymfomer har resistente celler og endnu ikke kan kureres, i modsætning til de aggressive lymfomer.





FIGUR 3

**Immununddragelse.** Når cytotoxiske T-celler (CTL) stimuleres ved antigenkendelse og kostimulerende cytokiner, opreguleres immuncheckpoints som PD-1, TIM3, LAG3 og CTLA4, som hæmmer T-cellernes aktivitet ved binding til deres respektive ligander. Liganderne opreguleres i mikromiljøet, herunder især tumorassocierede makrofager (TAM), som respons på T-cellernes cytokinfrigivelse. Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) nedbryder tryptofan og er særligt udtrykt af dendritceller (DC), men også non-Hodkin-lymfomceller (NHL) og hæmmer aktiviteten af CTL.



MHC = *major histocompatibility complex*; TCR = T-celle receptor.

teriserer en udtrættet T-cellepopulation, bl.a. pga. overstimulation fra cytokiner, herunder IL12 (Figur 3) [6, 13, 15].

T-cellernes aktivitet reguleres også af tilgangen til essentielle næringsstoffer bl.a. aminosyrerne arginin og tryptofan. Tryptofan nedbrydes af enzymet indolamin-2,3-dioxygenase (IDO), hvilket resulterer i, at specielt cytotoxiske T-celler går i delingsstop (Figur 3). IDO udtrykkes normalt i forbindelse med inflammation og bidrager til kontrol af immunreaktioner. Via *tumour growth factor-β* spiller IDO en rolle i omdannelsen af Th-celler til Tregs og er overudtrykt i lymfomceller og DC'er i mikromiljøet [13, 16-18]. IDO spiller således både en rolle i rekruttering af immunsupprimerende celler og direkte hæmning af CTL'er. Arginin nedbrydes af arginase-1, som er en af nøglemekanismerne for MDSC'ers immunsupprimerende effekt i NHL [12].

#### MIKROMILJØETS PROGNOSTISKE BETYDNING

Både i FL og DLBCL har man ved genekspressionsprofilering (GEP) fundet prognostisk betydende signaturer, som stammer fra mikromiljøet [19, 20]. Man har siden

forsket i de enkelte cellers prognostiske betydning, og selvom der er enkelte tendenser, er der generelt ikke konsensus om, hvilke udfald cellerne prædikerer. Forskelle i behandling af de forskellige kohorter lader til at have særlig indflydelse på cellernes prognostiske betydning. Eksempelvis har makrofagers prognostiske betydning ændret sig efter indførelsen af rituximab, men lader også til at influeres af hydroxydaunorubicin [21, 22]. En accepteret forklaring er, at makrofagerne bidrager med antistofafhængig celledødelig cytotoxicitet ved Fc-receptorbinding til rituximab. Generelt lader makrofager og T-celler til have størst prognostisk indflydelse, hvilket fremgår af GEP-studiet [19]. I FL anses infiltrationsgraden af CD8-T-celler som positiv prognostisk markør, men for DLBCL er der i et flertal af studier påvist, at cellerne repræsenterer en ugunstig profil [23, 24]. Der er ikke konsensus om den prognostiske betydning af Tregs, men nuværende data tyder på, at de er en gunstig markør i FL og germinalcentertype DLBCL, men en ugunstig markør i aktiveret B-celletype DLBCL [25]. Generelt er der ikke nogen klar sammenhæng mellem cellernes formodede funktion i mikromiljøet og deres prognostiske betydning, men cellernes interaktion med de enkelte lægemidler ser ud til at være en vigtig faktor.

#### TERAPEUTISKE PERSPEKTIVER

Der er adskillige nye lægemidler på vej til behandling af NHL. Flere af disse lægemidler påvirker mikromiljøets samspil med tumoren. Lenalidomid er et immunmodulerende lægemiddel, som har været anvendt ved myelomatose i flere år. Det kan genetablere defekt synapsdannelse mellem CTL og lymfomcellerne og øge antallet og aktiveringen af NK-celler [26]. Lenalidomid er godkendt til patienter, der har MCL med behandlingsvigt eller tilbagefald, og det undersøges i fase 3-studier ved DLBCL, FL og marginalzonenlymfom.

Grundet B-celle-receptorens vigtige rolle for lymfomcellernes trivsel er der udviklet adskillige lægemidler, som hæmmer enzymer i B-celle-receptorkaskaden f.eks. milttyrosinkinase, Brutons tyrosinkinase og fosfoinositid 3-kinase [3]. De bedst undersøgte lægemidler til behandling af NHL er ibrutinib og idelalisib, hvor ibrutinib er godkendt som andenlinjebehandling af MCL og undersøges i fase 3-studier ved de øvrige NHL-undertyper.

Immuncheckpointinhibitorer er blandt de lægemidler, der har opnået mest opmærksomhed og anerkendelse inden for kræftbehandling, og stormer frem som førstelinjekræftbehandling ved flere kræftformer. Det er antistoffer, som blokerer de hæmmende signaler mellem mikromiljøet og de cytotoxiske T-celler, hvilket favoriserer T-cellernes naturlige antitumorrespons. PD-1-antistoffet nivolumab blev for nylig EMA-godkendt til behandling af Hodgkin-lymfom og er det bedst

undersøgte checkpointantistof mod NHL. Ved brug som monoterapi er der i fase 1-forsøg fundet responsrater på hhv. 36% og 40% i DLBCL og FL, og adskillige fase 2-forsøg med PD1-antistoffer er siden blevet initieret til patienter med NHL [27].

Vi har på Center for Cancer Immunoterapi påvist, at der hos patienter findes cytotoxiske T-celler, som kan genkende immuncheckpoints og slå både kræftceller og immunhæmmende celler ihjel [28]. Vi har således identificeret særligt immunogene peptidsekvenser fra både IDO, PD-L1 og PD-L2 og udviklet kræftvacciner baseret på disse peptider [29]. Da immunhæmmende celler modvirker de ønskede virkninger af immunterapi, kan vaccination imod f.eks. IDO eller PD-L1 være et lovende supplement til nuværende og fremtidige terapiformer, herunder kimærisk antigenreceptor-T-cel-leterapi. IDO-vaccinen er testet ved lungecancer med lovende resultater, og PD-L1-vaccinen indgår i et ny-startet fase 1-studie ved myelomatose (NCT03042793) [30]. På grund af mikromiljøets betydelige rolle ved lymfomer er vi ved at starte et fase 1-forsøg, hvor vi vil vaccinere patienter med FL med de dele af PD-L1- og PD-L2-proteinet, som vi ved, at immunforsvarets T-celler kan reagere imod.

## KONKLUSION

Forståelse af mikromiljøets rolle i lymfomagenesen har åbnet for nye muligheder for målrettet behandling. Cellerne i mikromiljøet kan påvirke effekten af en given behandling, som omvendt kan påvirke sammensætningen af mikromiljøet. Flere celler og mekanismer indgår i immunsuppression, som hæmmer immunforsvarets eget antitumorrespons, og bør adresseres i forbindelse med immunoterapi. Der er lovende behandlingsmuligheder på vej, hvor mikromiljøet indgår, og en bedre forståelse af samspillet mellem behandling og mikromiljø er et skridt på vejen til at sammensætte den bedste behandling til den enkelte patient.

## SUMMARY

Uffe Klausen, Mads Hald Andersen & Lars Møller Pedersen:

Micro-environment being agonist as well as antagonist in B-cell non-Hodgkin lymphoma pathology  
Ugeskr Læger 2017;179:V03170220

The tumour micro-environment has emerged as an essential component in B-cell non-Hodgkin lymphoma pathology, with both nurturing and protective cells. The diversity and impact of the micro-environment seems to be greater in the indolent lymphoma types, while the aggressive subtypes are more independent. The prognostic impact of the environmental cells seems to depend on the specific treatment, and novel treatments targeting the micro-environment are emerging. Immune checkpoints, expressed by lymphomas, serve as promising targets for immune checkpoint inhibitors and vaccination therapy.

**KORRESPONDANCE:** Uffe Klausen. E-mail: uffe.klausen@regionh.dk

**ANTAGET:** 27. juni 2017

**PUBLICERET PÅ UGESKRIFTET.DK:** 25. september 2017

**INTERESSEKONFLIKTER:** ingen. Forfatterens ICMJE-formularer er tilgængelige sammen med artiklen på Ugeskriftet.dk

## LITTERATUR

1. Grulich AE, Vajdic CM. The epidemiology of non-Hodgkin lymphoma. *Pathology* 2005;37:409-19.
2. Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat Rev Cancer Nature Research* 2014;14:517-34.
3. Blum KA. B-cell receptor pathway modulators in NHL. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2015;2015:82-91.
4. Pangault C, Amé-Thomas P, Ruminy P et al. Follicular lymphoma cell niche: identification of a preeminent IL-4-dependent T(FH)-B cell axis. *Leukemia InSerm* 2010;24:2080-9.
5. Kurtova AV, Tamayo AT, Ford RJ et al. Mantle cell lymphoma cells express high levels of CXCR4, CXCR5, and VLA-4 (CD49d): importance for interactions with the stromal microenvironment and specific targeting. *Blood* 2009;113:4604-13.
6. Yang Z-Z, Price-Troska T, Novak AJ et al. The exhausted intratumoral T cell population in B-cell non-Hodgkin lymphoma is defined by LAG-3, PD-1 and TIM-3 expression. *Blood* 2015;126:2661.
7. Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Pathogenesis of follicular lymphoma. *J Clin Invest* 2012;122:3424-31.
8. Guilloton F, Caron G, Ménard C et al. Mesenchymal stromal cells orchestrate follicular lymphoma cell niche through the CCL2-dependent recruitment and polarization of monocytes. *Blood* 2012;119:2556-67.
9. Clear AJ, Lee AM, Calaminici M et al. Increased angiogenic sprouting in poor prognosis FL is associated with elevated numbers of CD163+ macrophages within the immediate sprouting microenvironment. *Blood* 2010;115:5053-6.
10. Yang Z-Z, Novak AJ, Ziesmer SC et al. Attenuation of CD8(+) T-cell function by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 2006;66:10145-52.
11. Yang ZZ, Novak AJ, Ziesmer SC et al. CD70+ non-Hodgkin lymphoma B cells induce Foxp3 expression and regulatory function in intratumoral CD4+CD25 T cells. *Blood* 2007;110:2537-44.
12. Lin Y, Gustafson MP, Bulur PA et al. Immunosuppressive CD14+HLA-DR(low)/-monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2011;117:872-81.
13. Laurent C, Charmpi K, Gravelle P et al. Several immune escape patterns in non-Hodgkin's lymphomas. *Oncoimmunology* 2015;4:e1026530.
14. Rozali EN, Hato SV, Robinson BW et al. Programmed death ligand 2 in cancer-induced immune suppression. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:656340.
15. Yang Z-Z, Liang A-B, Ansell SM. T-cell-mediated antitumor immunity in B-cell non-Hodgkin lymphoma: activation, suppression and exhaustion. *Leuk Lymphoma* 2015;56:2498-504.
16. Liu X-Q, Lu K, Feng L-L et al. Up-regulated expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 in non-Hodgkin lymphoma correlates with increased regulatory T-cell infiltration. *Leuk Lymphoma* 2014;55:405-18.
17. Ninomiya S, Hara T, Tsurumi H et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor tissue indicates prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Ann Hematol* 2011;90:409-16.
18. Chen W. IDO: more than an enzyme. *Nat Immunol Nature Research* 2011;12:809-11.
19. Dave SS, Wright G, Tan B et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med* 2004;351:2159-69.
20. Lenz G, Wright G, Dave SS et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2008;359:2313-23.
21. Kridel R, Xerri L, Gelas-Dore B et al. The prognostic impact of CD163-positive macrophages in follicular lymphoma: a study from the BC cancer agency and the lymphoma study association. *Clin Cancer Res* 2015;21:3428-35.
22. Riihijärvi S, Fiskvik I, Taskinen M et al. Prognostic influence of macrophages in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a correlative study from a Nordic phase II trial. *Haematologica* 2015;100:238-45.
23. Sugimoto T, Watanabe T. Follicular lymphoma: the role of the tumor microenvironment in prognosis. *J Clin Exp Hematop* 2016;56:1-19.
24. Oudejans JJ, Muris JJF, Cillessen SAGM et al. T-cell response in B-cell lymphomas: favorable or unfavorable? *Clin Cancer Res* 2008;14:2514.
25. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P et al. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2008;93:193-200.
26. Gribben JG, Fowler N, Morschhauser JG. Mechanisms of action of lenalidomide in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol* 2015;33:2803-11.
27. Lesokhin AM, Ansell SM, Armand P et al. Nivolumab in patients with relapsed or refractory hematologic malignancy: preliminary results of a phase Ib study. *J Clin Oncol* 2016;34:2698-704.
28. Andersen MH. Immune regulation by self-recognition: novel possibil-

- ities for anticancer immunotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2015;107:djv154.
29. Andersen MH. The targeting of immunosuppressive mechanisms in hematological malignancies. *Leuk* 2014;28:1784-92.
  30. Iversen T, Engell-Nørregård L, Ellebæk E et al. Lack of toxicity during long-lasting disease stabilization in metastatic lung cancer patients vaccinated with an HLA-A2-restricted epitope derived from indoleamine 2,3-dioxygenase. *Clin Cancer Res* 2014;20:221-32.