

E. Pastille, A. M. Westendorf, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Essen.

25. März 2015

Immuntherapie bei Colitis-assoziiertem Darmkrebs - erste experimentelle Ansätze

Colitis ulcerosa Patienten tragen ein erhöhtes Darmkrebsrisiko. Etwa 5% der Patienten, die an Colitis ulcerosa leiden, entwickeln Kolonkarzinome. Die zugrunde liegenden immunologischen Mechanismen sind dabei weitgehend unbekannt. Eine neue Studie zeigt nun, dass regulatorische T-Zellen ganz entscheidend an der Entstehung und Progression von Colitis-assoziiertem Darmkrebs beteiligt sind. Erste immuntherapeutische Ansätze im Mausmodell zeigen, dass die Depletion von regulatorischen T-Zellen zum Zeitpunkt der einsetzenden Tumorprogression das Tumorstadium minimieren kann. Die experimentellen Befunde machen deutlich, dass eine Kombination aus konventioneller Tumorthherapie und gezielter Inaktivierung von regulatorischen T-Zellen den Therapieerfolg bei Colitis-assoziiertem Darmkrebs verbessern könnte.

Chronische Entzündung des Darms

Die Colitis ulcerosa ist eine chronische Darmerkrankung, die zu Entzündungen und Ulzerationen in der oberen Schicht der Darmschleimhaut führt. Die Krankheit beginnt stets im Rektum und weitet sich bei etwa der Hälfte der Betroffenen auf andere Abschnitte des Dickdarms, selten auch bis in den Dünndarm, aus. Colitis ulcerosa verläuft schubweise progredient, und weist vielfach extraintestinale Manifestationen auf. Die Entzündungen im Darm verursachen eine häufige Entleerung des Darms. Das vorherrschende Symptom ist deshalb die Diarrhoe. Wenn die Entzündungen die oberste Zellschicht der Darmschleimhaut zerstört haben, bilden sich Ulzerationen, die bluten und Schleim absondern können - es entsteht blutige Diarrhoe mit Schleimbeimengungen und Leibscherzen. Erkrankte leiden manchmal auch unter Müdigkeit, Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust. Die Verläufe können im Schweregrad sehr unterschiedlich sein.

Epidemiologie

In der westlichen Welt wird die Prävalenz von Colitis ulcerosa auf 160 bis 250 pro 100.000 Einwohner geschätzt, Männer und Frauen sind etwa gleich häufig betroffen. Die Inzidenz liegt in Deutschland bei 3-4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr. Die höchste altersspezifische Inzidenz liegt bei den 16- bis 25-Jährigen vor, bei 15-25% aller Patienten treten die ersten Symptome vor dem 20. Lebensjahr auf.

Ätiologie

Trotz großer wissenschaftlicher Bemühungen konnten die Ursachen der Colitis ulcerosa noch nicht ergründet werden. Möglicherweise geht die Krankheit auf Störungen des Immunsystems zurück. Colitis ulcerosa ist eine

autoentzündliche Erkrankung und tritt familiär gehäuft auf. Es wird angenommen, dass die übersteigerte entzündliche Reaktion der Schleimhaut des Dickdarms durch eine veränderte Wechselwirkung des Immunsystems mit dem Mikrobiom des Darms zustande kommt (1). Die natürliche Toleranz gegenüber der normalen Darmflora ist durchbrochen; es finden sich Antikörper gegen bakterielle Antigene. Studien belegen heute deutlich, dass dem chronisch-rezidivierenden Charakter der Entzündung v.a. eine Fehlregulation von intestinalen T-Lymphozyten mit nachfolgender pathologisch gesteigerter Immunantwort und einem Ungleichgewicht von pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokinen zugrunde liegt. Für die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase und der Kontrolle von Entzündungsprozessen sind regulatorische T-Zellen von zentraler Bedeutung, da sie in der Lage sind, exzessive Immunantworten zu unterdrücken. Mittels verschiedener Experimente in Mausmodellen und humanen Studien wurde deren Bedeutung für die Entstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen bereits untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in einer T-Zell-induzierten Colitis die Pathologie der Entzündung durch den adoptiven Transfer von regulatorischen T-Zellen verhindert werden kann (2, 3). Auch die Verbesserung bzw. die Steigerung der Funktion, Anzahl und Aktivität von regulatorischen T-Zellen führte in Colitis-Mausmodellen und in humanen Therapie-Ansätzen zu einer gemilderten Ausprägung der intestinalen Entzündung (4, 5). Für Patienten mit aktiver chronischer Darmentzündung wurde, im Vergleich zu gesunden Individuen, generell ein geringerer Anteil an regulatorischen T-Zellen im Blut beschrieben, während die Anzahl von funktionell aktiven regulatorischen T-Zellen in der intestinalen Mukosa erhöht war (6, 7). Aufgrund dieser Beobachtungen wird der immuntherapeutische Einsatz von regulatorischen T-Zellen bei der Behandlung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen diskutiert.

Colitis ulcerosa und Darmkrebs

Patienten mit langjähriger Colitis ulcerosa haben ein erhöhtes Risiko an Darmkrebs zu erkranken. In mehreren Mausmodellen konnte bereits gezeigt werden, dass eine chemische oder genetische Induktion von intestinalen Entzündungen mit einer erhöhten Inzidenz von Darmkrebs einhergeht (8, 9). Zusätzlich zur genomischen Instabilität, die den Prozess der Tumorgenese charakterisiert, scheint die chronische Entzündung im Darm ein Schlüsselfaktor im Colitis-assoziierten Darmkrebs zu sein. Das Risiko von Colitis-assoziiertem Darmkrebs steigt in Hinsicht auf Entzündungsgrad, Familienanamnese, Krankheitsdauer und der Ausbreitung entzündeter Stellen. Sitzt der Entzündungsherd im Rektum oder dem Sigma, ist das Krebsrisiko kaum erhöht. Ist jedoch der gesamte Dickdarm befallen, erkranken die Patienten mit 32-mal höherer Wahrscheinlichkeit an Darmkrebs als die Normalbevölkerung. Die genauen molekularen und zellulären Mechanismen, die zur Tumorentstehung und -progression führen, sind bislang ungeklärt.

Obwohl regulatorische T-Zellen eine protektive Funktion bei intestinalen Entzündungen ausüben, wird ihre Rolle im Kontext der Tumorentstehung eher als schädlich gesehen, da sie in der Lage sind, die Anti-Tumor-Immunantwort zu unterdrücken. Es wurde bereits für verschiedene Krebsarten, unter anderem auch für Darmkrebs, eine erhöhte Anzahl von regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut der Patienten, aber auch in direkter Tumorumgebung und im Tumorgewebe beschrieben (10, 11).

Colitis-assoziiertes Darmkrebs und regulatorische T-Zellen

In einer aktuellen Studie wurde untersucht, in wieweit regulatorische T-Zellen an der Entstehung von Tumoren bei Colitis-assoziiertem Darmkrebs beteiligt sind (11). Hierzu wurde ein Mausmodell verwendet, bei dem durch die sequentielle Behandlung mit Azoxymethan (AOM) und Dextran Natriumsulfat (DSS) innerhalb von 12 Wochen die Entstehung von Tumoren spezifisch im Dickdarm ausgelöst wird (12). Durch die einmalige intraperitoneale

Applikation des methylierenden Agens AOM wird eine DNA-Schädigung ausgelöst, welche als Tumorentstehung wirkt. Die wiederholte Gabe von DSS über das Trinkwasser induziert eine starke Entzündungsreaktion im Darm; die Versuchstiere zeigen blutige Diarrhoe und einen deutlichen Gewichtsverlust. Zwölf Wochen nach Beginn der AOM/DSS-Behandlung kann mit Hilfe einer nicht-invasiven Mini-Koloskopie die Tumorentstehung verfolgt und quantifiziert werden (Abb. 1). Um die Bedeutung von regulatorischen T-Zellen in diesem Modell zu analysieren, wurde nach erfolgreicher Induktion von Colitis-assoziiertem Darmkrebs der prozentuale Anteil von CD4+ Foxp3+ regulatorischen T-Zellen in der Milz, den mesenterischen Lymphknoten und der lamina propria des Kolons mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass es im Kolon, nicht jedoch in der Milz oder den mesenterischen Lymphknoten, der mit AOM/DSS behandelten Versuchstiere zu einer signifikanten Zunahme von regulatorischen T-Zellen kommt (Abb. 2a). Genauere immunhistochemische Analysen ergaben, dass sich regulatorische T-Zellen direkt im Tumorgewebe anreichern (Abb. 2b) und damit vermutlich an der Inhibition einer Anti-Tumor-Antwort beteiligt sind.

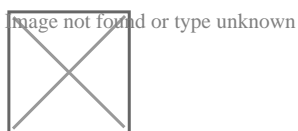


Abb. 1: Induktion von Colitis-assoziiertem Darmkrebs in der Maus. Endoskopische Aufnahmen des distalen Kolons einer gesunden Maus und nach Applikation von Azoxymethan (AOM) und Dextran Sulfat (DSS).

Um zu überprüfen, ob regulatorische T-Zellen auch direkt an der Tumorentstehung beteiligt sind, wurde ein Mausmodell angewendet, bei dem die spezifische Depletion von regulatorischen T-Zellen in vivo möglich ist. Da regulatorische T-Zellen essentiell für die Kontrolle der intestinalen Homöostase sind, erfolgte eine Depletion von regulatorischen T-Zellen nicht während der Entzündungsphase, sondern zum Zeitpunkt der einsetzenden Tumorentstehung. Bei diesem Versuchsansatz konnte sowohl durch die pathologische Beurteilung als auch durch die endoskopische Untersuchung des distalen Kolons der Versuchstiere gezeigt werden, dass die Depletion von regulatorischen T-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl und der Größe der Darmtumore führt (Abb. 3a und b). Zytotoxische CD8+ T-Zellen sind in der Lage dysplastische Zellen zu beseitigen und spielen damit eine entscheidende Rolle während einer Anti-Tumor-Antwort (13, 14). Neben der generellen Expansion von CD8+ T-Zellen machten die Studienergebnisse deutlich, dass die Depletion von regulatorischen T-Zellen auch zu einer Erhöhung der zytotoxischen Aktivität dieser Zellen führte, welche durch eine gesteigerte Produktion von Interferon- γ und Granzym B gekennzeichnet war (Abb. 3c).

Diese aktuellen Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass regulatorische T-Zellen bei Colitis-assoziiertem Darmkrebs eine CD8+ T-Zell-vermittelte Anti-Tumor-Immunantwort unterdrücken und dadurch die Tumorentstehung begünstigen.

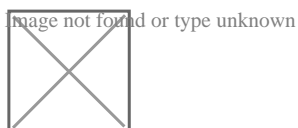


Abb. 2: Verteilung von regulatorischen T-Zellen nach Induktion von Colitis-assoziiertem Darmkrebs. a) Anteil der Foxp3+ regulatorischen T-Zellen an CD4+ T-Zellen in der Milz, den mesenterischen Lymphknoten und der lamina propria des Kolons; bestimmt mittels Durchflusszytomtrie. b) Immunhistochemischer Nachweis von Foxp3+ Zellen im distalen Kolon (***, $p < 0,001$).

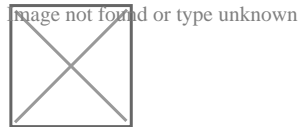
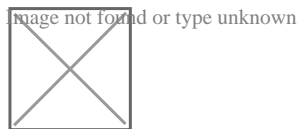


Abb. 3: Die Depletion von regulatorischen T-Zellen reduziert die Tumorprogression im Colitis-assoziierten Darmkrebs. a) Tumorausbreitung im distalen Kolon. b) Endoskopische Aufnahmen des distalen Kolons von AOM/DSS-behandelten Mäusen in Woche 12. c) Granzym B (GzmB)- und Interferon-g (IFN-g)-Expression von CD8+ T-Zellen des Kolons; bestimmt mittels Durchflusszytomtrie (*, $p < 0,05$).

Fazit

Die immunologische Manipulation von regulatorischen T-Zellen stellt ein attraktives Target für die Entwicklung neuartiger Krebstherapien bei Colitis-assoziiertem Darmkrebs dar. Es muss allerdings in zukünftigen Studien geklärt werden, wie sich die spezifische Depletion von regulatorischen T-Zellen therapeutisch für den Menschen umsetzen lässt und ob eine Kombination mit anderen immuntherapeutischen Ansätzen effektiv die Tumorgenese verhindern bzw. die Progression verlangsamen kann.

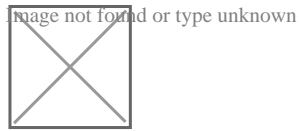


Prof. Dr. rer. nat. Astrid M. Westendorf

Institut für Medizinische Mikrobiologie
Universitätsklinikum Essen
Virchowstraße 179
45147 Essen

Tel.: 0201/7231826

E-Mail: astrid.westendorf@uk-essen.de



Dr. rer. nat. Eva Pastille

Institut für Medizinische Mikrobiologie
Universitätsklinikum Essen
Virchowstraße 179
45147 Essen

Tel.: 0201/7233093

E-Mail: eva.pastille@uk-essen.de

Abstract

E. Pastille, A. M. Westendorf, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Essen

In patients suffering from ulcerative colitis the persistent inflammation of the colon is associated with an elevated risk of colorectal cancer. The underlying immunological mechanisms are not well understood. A recent study provides insights into the importance of regulatory T cells in the induction and progression of colitis-associated colon cancer. First immunotherapeutical approaches in a mouse model of colitis-associated colon cancer demonstrated that the transient ablation of regulatory T cells during tumor development suppresses tumor outgrowth and distribution. Thus, the modulation of regulatory T cell numbers can evoke antitumor responses and may have implications for immunotherapeutic interventions in patients suffering from colitis-associated colon cancer.

Keywords: *ulcerative colitis, colon cancer, regulatory T cells*

Literaturhinweise:

- (1) Abraham C, Cho JH. N Engl J Med 2009; 19;361(21):2066-78.
- (2) Powrie F et al. J Exp Med 1994; 1;179(2): 589-600.
- (3) Westendorf AM et al. Gastroenterology 2006; 131(2):510-24.
- (4) Boschetti G et al. Inflamm Bowel Dis 2011; 17(1):160-70.
- (5) Collins CB et al. Mucosal Immunol 2013; 6(5):960-71.
- (6) Fleissner D et al. Immunology 2011; 134(1):82-92.
- (7) Maul J et al. Gastroenterology 2005; 128(7):1868-78.
- (8) Cooper HS et al. Carcinogenesis 2000; 21(4):757-68.
- (9) Okayasu I et al. Gut 1996; 39(1):87-92.
- (10) Ling KL et al. Cancer Immun 2007;7:7.
- (11) Pastille E et al. Cancer Res 2014; 74(16): 4258-69.

(12) Greten FR et al. Cell 2004; 118(3):285-96.

(13) Cullen SP et al. Cell Death Differ 2010; 17(4):616-23.

(14) Zhang N, Bevan MJ. Immunity 2011; 35(2):161-8.