

# CLL-1 komt tot expressie op leukemische stamcellen in acute myeloïde leukemie

**Auteurs** A. van Rhenen, G.J. Ossenkuppele, P.C. Huijgens en G.J. Schuurhuis

**Trefwoorden** acute myeloïde leukemie, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, CLL-1, minimale restziekte, stamcel

## Samenvatting

'C-type lectin-like molecule-1' (CLL-1) komt tot expressie op leukemische CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-cellen (leukemische stamcellen; LSC) met een mediane expressie van 35% (spreiding 0-100%, n=89). De CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-cellen in normaal beenmerg hebben geen CLL-1-expressie, zoals de normale CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-cellen in regenererend beenmerg. Nadat met chemotherapie een complete remissie is bereikt, zijn er patiënten met persisterende CLL-1-expressie op de CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-populatie. Deze patiënten hebben een grotere kans op een

recidief dan patiënten bij wie na chemotherapie geen CLL-1-expressie meer detecteerbaar is. De detectie van LSC na chemotherapie met behulp van anti-CLL-1 zou dus betekenisvol kunnen zijn om de kans op een recidief te schatten, maar daarnaast zou het CLL-1-antigeen een doelwit kunnen zijn voor, tegen de leukemische stamcel gerichte, behandeling bij acute myeloïde leukemie, bijvoorbeeld door anti-CLL-1 te koppelen aan een cytotoxisch agens.

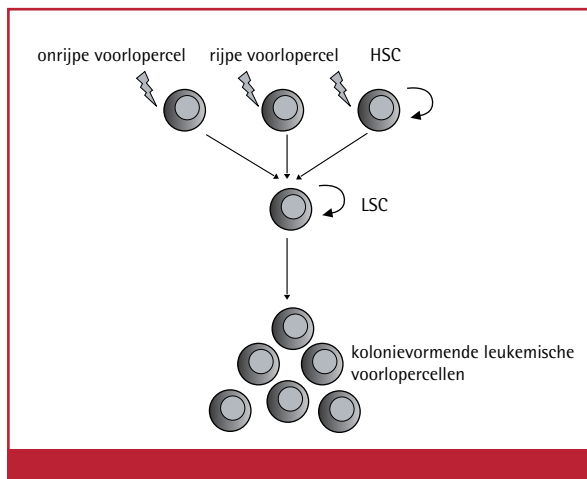
*(Ned Tijdschr Hematol 2008;5:43-7)*

## Inleiding

Acute myeloïde leukemie (AML) komt voor bij kinderen en volwassenen. De oorzaak van deze vorm van leukemie is onbekend. Bij kinderen met AML kan ongeveer 50% worden genezen; bij volwassenen tot 60 jaar is dit ongeveer 40%. Oudere patiënten hebben een overleving van slechts 10%.<sup>1,2</sup> Door middel van autologe stamceltransplantatie is het mogelijk geweest de dosering chemotherapie sterk te verhogen, maar het inzetten van een allogene stamceltransplantatie en het gebruik van nieuwe middelen kunnen de prognose wellicht verbeteren.

AML wordt over het algemeen beschouwd als een ziekte die bestaat uit een heterogene blastenpopulatie van leukemische stamcellen (LSC) en rijpere voorlopercellen. Bonnet en Dick hebben in 1997 aangetoond dat voor de patiënten met CD34<sup>+</sup>-leukemie (ongeveer 80% van de AML-patiënten), de stamcel aanwezig is in het compartiment dat gekenmerkt wordt door de aanwezigheid van de cel-

oppervlaktemarker CD34 en de afwezigheid van de celoppervlaktemarker CD38 (vanaf nu CD34<sup>+</sup>-CD38<sup>-</sup>-compartiment genoemd).<sup>3</sup> Aangezien een normale hematopoëtische stamcel (HSC) zich ook in het CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-compartiment bevindt, lijkt het aannemelijk dat de LSC ontstaat door afwijken in de HSC.<sup>3</sup> Een andere hypothese is dat een leukemie-initiërende gebeurtenis niet plaatsvindt in het HSC-compartiment, maar in de normale voorlopercellen, wat maakt dat deze voorlopercellen zichzelf kunnen vernieuwen en vervolgens maligne kunnen ontaarden (zie *Figuur 1* op pagina 44).<sup>4-6</sup> De overige 20% van de AML-patiënten heeft CD34<sup>-</sup>-blasten; mogelijk bevinden de stamcellen zich bij hen in de zogenoemde 'side population' (SP).<sup>7</sup> De LSC hebben veel eigenschappen gemeen met de HSC: een LSC heeft net als de HSC het vermogen tot zelfvernieuwing, beide zijn CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, en beide zijn in staat toxische stoffen efficiënt uit de cel te pompen.<sup>3,8</sup> Naast de genoemde eigenschappen die

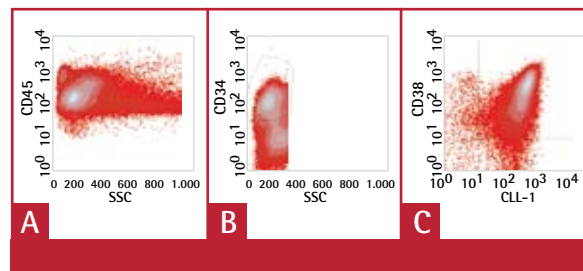


**Figuur 1.** Schematisch overzicht van de mogelijke ontstaansmechanismen van leukemische stamcellen (LSC) uit normale voorlopercellen of hematopoëtische stamcellen (HSC). De LSC onderhoudt de leukemische voorloperpopulatie en kan zichzelf, net als de HSC, vernieuwen.

beide stamcelcompartimenten delen, hebben Costello et al. aangetoond dat de LSC weinig gevoelig zijn voor chemo- en voor immuuntherapie.<sup>9</sup> Daarnaast hebben Guan et al. laten zien dat de LSC zich in een rustende fase van de celcyclus bevinden.<sup>10</sup>

Eerder is gevonden dat de prognose van een AML-patiënt afhankelijk is van het aantal maligne stamcellen (de stamcelfrequentie) in het beenmerg bij diagnose. Patiënten met een hoger percentage CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-cellen bij diagnose hadden meer minimale restziekte na chemotherapie ('minimal residual disease'; MRD).<sup>11</sup> Hierbij was, vanwege het nog ontbreken van voldoende leukemischestamcelmarkers, het gehele CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-stamcelcompartiment onderzocht. Aangezien later, met behulp van specifieke AML-stamcelmarkers, bleek dat het overgrote deel van het compartiment uit AML-stamcellen bestond, heeft deze aanpak geen invloed gehad op de conclusies. Een hoge frequentie van deze MRD-cellen leidt tot een grotere kans op een recidief, zoals eerder in dit tijdschrift bericht is.<sup>12</sup> In overeenstemming hiermee bleek dat een hoge CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-frequentie ook rechtstreeks een hogere kans op een recidief voorspelde.

Algemeen wordt gedacht dat genezing van AML-patiënten gevonden moet worden in het aanpakken van het malignestamcelcompartiment. Daarom zouden nieuwe middelen of behandelstrategieën in de ontwikkelingsfase ook getest moeten worden op leukemiestamcellen. Een van de mogelijkheden hierbij



**Figuur 2.** Flowcytometriebeeld van CLL-1-expressie op CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-cellen van een patiënt met acute myeloïde leukemie bij diagnose. A. De blasten zijn met een lage CD45-expressie en een lage zijwaartse lichtverstrooiing ('side scatter'; ssc) op standaardwijze gedefinieerd. Deze cellen zijn aangeduid binnen de door een lijn gedefinieerde regio. B. Beeld van de expressie van CD34 op deze blastenpopulatie; de CD34<sup>+</sup>-populatie ligt binnen de aangegeven regio. C. Deze CD34<sup>+</sup>-populatie laat zien dat CLL-1 tot expressie komt op de CD38<sup>-</sup>-populatie (LSC-populatie), maar ook op de CD38<sup>+</sup>-cellen (leukemische voorloperpopulatie). De cellen links onder en links boven zijn hoogstwaarschijnlijk resterende normale cellen (HSC en voorlopercellen), die, naar verwachting, geen CLL-1-expressie hebben. In een aantal gevallen is dit ook met behulp van FISH-analyse aangetoond.

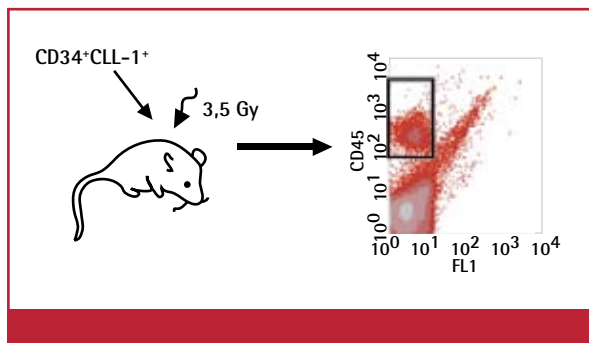
is het ontwikkelen van therapieën, die gericht zijn tegen antigenen op het LSC-celmembran. Omdat de normale HSC gespaard moet worden, zouden deze antigenen niet op de normale HSC aanwezig moeten zijn. Op deze manier kan mogelijk een stamcelgerichte therapie gevonden worden, die het normale stamcelcompartiment ongemoeid laat. In dit artikel wordt het 'C-type lectin-like molecule-1' (CLL-1) als een dergelijk kandidaatantigeen beschreven.<sup>13</sup>

## Resultaten

### *CLL-1-expressie in normaal beenmerg en perifeer bloed*

Bakker et al. toonden eerder aan dat CLL-1 tot expressie komt op het merendeel van de blasten van AML-patiënten bij diagnose.<sup>14</sup> Gevonden werd dat het aantal patiënten met CLL-1-positieve AML ongeveer even groot is als het aantal patiënten met CD33<sup>+</sup>-AML. CD33 is het antigeen, dat het doelwit is van de behandeling met gemtuzumab ozogamicin, ofwel anti-CD33-therapie.

In normaal beenmerg en perifeer bloed komt CLL-1 tot expressie op 30-40% van de voorlopercellen (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) en op een deel van de neutrofiële granulocyten, monocyten en voorloperdendritische cellen.<sup>13</sup> CLL-1 komt niet tot expressie op



**Figuur 3.** Een NOD/SCID-muis wordt voor transplantatie bestraald met 3,5 Gy. Vervolgens worden CD34<sup>+</sup>CLL-1-positieve cellen ingespoten via de staartvene. Na 6-8 weken wordt het beenmerg van de muis verzameld. Met behulp van humaan-specifieke anti-CD45-antistoffen kan worden bekeken of er humane cellen in het beenmerg van de muis zitten en wat het percentage is. In dit voorbeeld is een duidelijke humane CD45<sup>+</sup>-populatie aanwezig in het beenmerg van de muis.

de erythroïde en megakaryocyttaire voorlopercellen. Daarnaast komt CLL-1 niet tot expressie in andere weefsels.<sup>14</sup> Tevens werd gevonden dat anti-CLL-1 internaliseert in de cel die CLL-1 tot expressie brengt.<sup>14</sup> Dit heeft echter geen celdood tot gevolg. Voor therapeutische doeleinden zou het anti-CLL-1-antilichaam daarom, zoals anti-CD33, gekoppeld moeten worden aan een toxisch agens.

#### *CLL-1-expressie op CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-cellen bij AML op moment van diagnose*

Recentelijk is aangetoond dat CLL-1 ook tot expressie komt op de CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-cellen (de LSC-populatie) van AML-patiënten bij diagnose (zie *Figuur 2*).<sup>13</sup> Bij 89 patiënten werd aangetoond dat er een mediane CLL-1-expressie was van 35%, met een spreiding van 0-100%. Dit wil zeggen dat er zowel patiënten zijn zonder CLL-1-expressie op de LSC, als patiënten met 100% expressie op de LSC. Bij de patiënten met intermediaire percentages bleek dat meestal sprake was van een homogene, zij het lage, expressie op alle cellen. Omdat het onderscheid tussen positief en negatief werd gemaakt met behulp van een isotypecontrole, resulteert dit in percentages tussen 0 en 100%. Wanneer een antilichaam met een hogere affiniteit beschikbaar zou zijn, zou dat in deze laatste gevallen kunnen resulteren in 100% positiviteit. Tevens werd aangetoond dat CLL-1 niet tot expressie komt op de normale CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-cellen van rustend beenmerg bij gezonde donoren (n=10). Dit maakt CLL-1 tot een marker die bij diagnose specifiek aanwezig is op de LSC en niet op de HSC.

#### *NOD/SCID-assay voor CLL-1-positieve CD34<sup>+</sup>-cellen*

Eerder werd aangetoond dat CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-cellen van AML-patiënten leukemie kunnen veroorzaken, wanneer ze getransplanteerd worden in een 'non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency' (NOD/SCID)-muis.<sup>3</sup> De NOD/SCID-muis is ontvankelijk voor humane cellen, omdat deze muis een zeer beperkte T- en B-celfunctie heeft. Leukemische voorlopercellen (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) kunnen niet uitgroeien in een NOD/SCID-muis en deze behoren dus niet tot de stamcelpopulatie. Dit maakt het NOD/SCID-muismodel geschikt om stamceleigenschappen van een populatie te onderzoeken.

Met de cellen van 3 patiënten werd aangetoond dat de CD34<sup>+</sup>CLL-1-positieve populatie (die de CLL-1-positieve CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-LSC-populatie bevat) uitgroeit in de muis (zie *Figuur 3*).<sup>13</sup> De cellen die uitgroeiden in de muis, waren van myeloïde herkomst en vertoonden CLL-1-expressie, zoals werd verwacht wanneer uit het LSC-compartiment de originele tumor groeit.

#### *CLL-1-expressie op CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-cellen na chemotherapie*

Aangezien een belangrijk deel van ons onderzoek is gericht op de detectie en karakterisering van minimale restziekte bij AML, is tevens onderzocht of CLL-1 na chemotherapie nog tot expressie komt op de maligne CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-cellen. In dat geval zou een anti-CLL-1-antilichaam niet alleen gebruikt kunnen worden om restziekte op te sporen, maar ook om te dienen als een therapeutisch middel gericht tegen de LSC, die overblijven na chemotherapie. Daarvoor is eerst gekeken of in beenmerg na chemotherapie (regenererend beenmerg) de HSC-populatie, net als in normaal rustend beenmerg, geen CLL-1-expressie vertoonde. Dit was inderdaad het geval in regenererend beenmerg, verkregen van patiënten met acute lymfatische leukemie, CD34<sup>-</sup>AML en non-hodgkinlymfoom. Vervolgens werd de CLL-1-expressie van de CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-cellen in het beenmerg van AML-patiënten na chemotherapie onderzocht. Resultaten lieten zien dat bij meerdere patiënten, die bij diagnose CLL-1-expressie hadden op de LSC, na chemotherapie CLL-1-expressie op een deel van de CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-populatie werd gevonden. Uit voorlopige resultaten bleek dat een zeer laag tot afwezig percentage CLL-1-positieve CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-cellen gepaard ging met een gunstigere prognose: 8 van de 9 patiënten met een hoog percentage (mediaan 63%, uiteenlopend van 27-91%) kregen een recidief na mediaan 6 maanden

## Aanwijzingen voor de praktijk

1. Een hoger percentage 'C-type lectin-like molecule-1' (CLL-1)-positieve stamcellen bij diagnose leidt tot meer restziekte na chemotherapie en een slechtere overleving.
2. Effectieve therapie moet in staat zijn ook de leukemische stamcellen (LSC) aan te vallen.
3. Anti-CLL-1-antilichamen zouden een mogelijke LSC-gerichte therapie kunnen zijn, indien zij gekoppeld worden aan een celdodend agens.
4. CLL-1-antilichaam kan gebruikt worden voor het opsporen van residuale CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-LSC na chemotherapie.

(allen binnen een jaar), terwijl 4 van de 5 patiënten met een laag percentage (mediaan 0%, maximaal 2%) een lange remissieduur hadden (mediaan 33 maanden). Dit komt overeen met het idee dat de maligne CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-populatie is verdwenen door de chemotherapie, en dat de grote meerderheid van CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-cellen die dan overblijft, van normale herkomst is. Overigens is ook gevonden dat bij patiënten die geen CLL-1-expressie hebben als marker voor de LSC, er een aantal andere markers is die specifiek de LSC en niet de HSC karakteriseren, zoals CD7, CD19 en CD56.<sup>15</sup> Deze markers bieden dus extra mogelijkheden voor stamceldetectie na chemotherapie.

### Conjugatie van CLL-1 als therapeutisch target

Binding van anti-CLL-1 aan CLL-1-positieve cellen alleen leidt niet tot celdood. Of er andere effecten zijn van de binding van het antilichaam aan CLL-1 op de cel is onduidelijk. Voor therapeutische strategieën bij patiënten met CLL-1-positieve LSC lijkt het dus noodzakelijk om het anti-CLL-1-antilichaam te koppelen aan een toxisch agens. Hiervoor zijn verschillende mogelijkheden denkbaar. Allereerst zou er een toxisch chemotherapeutikum verbonden kunnen worden aan anti-CLL-1, zoals is gebeurd met anti-CD33, waaraan calicheamycine werd gebonden. Daarnaast bestaat de mogelijkheid om andere soorten toxines te koppelen aan anti-CLL-1. Zo is difterietoxine gebonden aan CD123-ligand, een combinatie die momenteel in fase I-onderzoek is. Hierbij zou het een probleem kunnen zijn dat het lichaam antistoffen vormt tegen de toxine. Ook is het mogelijk om radio-immunoconjugaten met anti-CLL-1 te maken, zoals

gebeurt met anti-CD20-therapie (Zevalin<sup>®</sup>) bij de behandeling van lymfomen. Naast CLL-1-positieve LSC zullen ook normale cellen, met name een deel van de granulocyttaire en monocyttaire voorlopers, en rijpe granulocyten en monocytten, onbewust doel zijn van de therapie. Daarentegen zijn de erythroïde en megakaryocyttaire voorlopers CLL-1-negatief. Dit laatste is van groot belang voor efficiënt bloedplaatjesherstel na therapie.

Opgemerkt dient te worden dat een antilichaamtherapie in AML waarschijnlijk altijd nog gecombineerd met of voorafgegaan moet worden door intensieve chemotherapie.

### Conclusie en perspectief

Het CLL-1-antigeen is een stabiele en specifieke marker voor CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-LSC gedurende behandeling en ziekte, en zou daarmee een potentieel doelwit kunnen zijn voor therapie. Dankzij de mogelijkheid om met behulp van CLL-1-expressie LSC te kwantificeren, kan CLL-1-expressie dienen als postdiagnose prognostische factor (stamcel-MRD-detectie). De gevonden additionele specifieke AML-stamcelmarkers kunnen weliswaar niet therapeutisch ingezet worden, maar wel aanvullend aan CLL-1 gebruikt worden voor stamcel-MRD-detectie.

### Referenties

1. Kaspers GJ, Creutzig U. Pediatric acute myeloid leukemia: international progress and future directions. *Leukemia* 2005;19:2025-29.
2. Löwenberg B, Griffin JD, Tallman MS. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc*

Hematol Educ Program 2003;82-101.

3. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3:730-7.

4. Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 2006;442:818-22.

5. Huntly BJ, Shigematsu H, Deguchi K, Lee BH, Mizuno S, Duclos N, et al. MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell* 2004;6:587-96.

6. Deshpande AJ, Cusan M, Rawat VP, Reuter H, Krause A, Pott C, et al. Acute myeloid leukemia is propagated by a leukemic stem cell with lymphoid characteristics in a mouse model of CALM/AF10-positive leukemia. *Cancer Cell* 2006;10:363-74.

7. Wulf GG, Wang RY, Kuehnle I, Weidner D, Marini F, Brenner MK, et al. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;98:1166-73.

8. Raaijmakers MH, De Grouw EP, Van der Reijden BA, De Witte TJ, Jansen JH, Raymakers RA. ABCB1 modulation does not circumvent drug extrusion from primitive leukemic progenitor cells and may preferentially target residual normal cells in acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 2006;12:3452-58.

9. Costello R, Mallet F, Chambost H, Sainty D, Arnoulet C, Gastaut JA, et al. The immunophenotype of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0): reduced immunogenicity and high frequency of CD34+/CD38- leukemic progenitors. *Leukemia* 1999;13:1513-8.

10. Guan Y, Gerhard B, Hogge DE. Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2003;101:3142-9.

11. Van Rhenen A, Feller N, Kelder A, Westra AH, Rombouts E, Zweegman S, et al. High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. *Clin Cancer Res* 2005;11:6520-7.

12. Schuurhuis GJ, Feller N, Huijgens PC, Ossenkoppele GJ. Minimale restziekte bij acute myeloïde leukemie: de waarde

van immunologische karakterisering. *Ned Tijdschr Hematol* 2006;3:44-52.

13. Van Rhenen A, Van Dongen GA, Kelder A, Rombouts EJ, Feller N, Moshaver B, et al. The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood* 2007;110:2659-66.

14. Bakker AB, Van den Oudenrijn S, Bakker AQ, Feller N, Van Meijer M, Bia JA, et al. C-type lectin-like molecule-1: a novel myeloid cell surface marker associated with acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 2004;64:8443-50.

15. Van Rhenen A, Moshaver B, Kelder A, Feller N, Nieuwint AW, Zweegman S, et al. Aberrant marker expression patterns on the CD34+CD38- stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the normal stem cell compartment both at diagnosis and in remission. *Leukemia* 2007;21:1700-7.

Ontvangen 30 augustus 2007, geaccepteerd 18 december 2007.

## Correspondentieadres

Mw. drs. A. van Rhenen, arts-onderzoeker  
Dhr. prof. dr. G.J. Ossenkoppele, internist-hematoloog  
Dhr. prof. dr. P.C. Huijgens, internist-hematoloog  
Dhr. dr. G.J. Schuurhuis, biochemicus en universitair  
hoofddocent

VU medisch centrum  
Afdeling Hematologie  
De Boelelaan 1117  
1081 HV Amsterdam  
Tel.: 020 444 26 04  
E-mailadres: gj.schuurhuis@vumc.nl

*Correspondentie graag richten aan de laatste auteur.*

Belangenconflict: geen gemeld.  
Financiële ondersteuning: geen gemeld.