

De expressie en de prognostische waarde van de perifere cannabinoïdreceptor bij hematologische maligniteiten

The expression and function of the peripheral cannabinoid receptor in hematological malignancies

N. Durdu-Rayman

Samenvatting

Op 23 september 2011 promoveerde mw. drs. N. Durdu-Rayman aan de Erasmus Universiteit Rotterdam op haar promotieonderzoek, getiteld 'The expression and function of the peripheral cannabinoid receptor in hematological malignancies', onder begeleiding van de promotores dhr. prof. dr. P. Sonneveld, dhr. prof. dr. H.R. Delwel en copromotor dhr. dr. K.H. Lam. Hieronder zijn de belangrijkste bevindingen van het onderzoek weergegeven.

(Ned Tijdschr Hematol 2013;10:78-80)

Summary

The 23rd of September 2011, N. Durdu-Rayman defended her thesis entitled 'The expression and function of the peripheral cannabinoid receptor in hematological malignancies' at the Erasmus University Rotterdam, under supervision of promotores professor S. Sonneveld, MD, PhD, and professor H.R. Delwel, MD, PhD, and co-promotor K.H. Lam, MD, PhD. The most important findings of this investigation are summarized in this report.

Inleiding

Eerder werd aangetoond dat de perifere cannabinoïdreceptor, CB2, tot expressie werd gebracht op humane B-cellen in de tonsil.¹ De expressiepatronen op overige hematopoëtische cellen en de maligne tegenhangers waren tot op heden nauwelijks onderzocht. De functie in humane cellen en een eventuele prognostische waarde van CB2-receptorexpressie bij humane hematologische maligniteiten was niet eerder beschreven. Wij zijn er in geslaagd om voor het eerst aan de hand van immunohistochemie de exacte expressiepatronen op normale immuuncellen te beschrijven.² De belangrijke functies van deze receptor, zoals migratie en differentiatieblok, die optreden na toediening van cannabinoïdliganden bij de muis, zijn verder onderzocht op humane cellijnen en primaire

acute myeloïde leukemie (AML).³ Tevens zijn immunohistochemische analyses gedaan op verschillende maligne non-hodgkinlymfomen (NHL), die een verscheidenheid aan expressiepatronen vertonen.⁴ De bestaande classificatiesystemen zoals beschreven voor het diffuus grootcellig lymfoom (DLBCL) zijn eveneens getoetst en tot slot werd de prognostische waarde van CB2 onderzocht in 3 klinische studies.^{5,6}

Cannabinoïdreceptoren

Cannabinoïdreceptoren behoren tot de familie van 7 transmembraan G-eiwit-gekoppelde receptoren (GPCR). CB2 werd in de muis geïdentificeerd als het doelwit in de 'common virus integration site' Evil1 met de retrovirale mutagenese insertietechniek. Dit

Auteur: mw. dr. N. Durdu-Rayman, internist-hematoloog, afdeling Interne Geneeskunde, Vlietland Ziekenhuis, Vlietlandplein 2, 3118 JH Schiedam, tel.: 010 893 51 05, e-mailadres: ndurdu@vlietlandziekenhuis.nl.

Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: geen gemeld.

Trefwoorden: G-eiwit-gekoppeld, immunohistochemie, leukemie, maligne lymfoom, perifere cannabinoïdreceptor, prognose

Key words: G-protein coupled, immunohistochemistry, leukemia, malignant lymphoma, peripheral cannabinoid receptor, prognosis

wijst op een mogelijke rol als een proto-oncogen in de leukemogenese. Er werden tot nu toe 2 cannabinoïd-receptoren gevonden. De humane centrale cannabinoïd-receptor (CB1) is voornamelijk gelokaliseerd op cellen in het centrale en perifere zenuwstelsel, terwijl de humane perifere cannabinoïd-receptor (CB2) voornamelijk wordt gevonden op de cellen van het immuunsysteem. Veel van het mechanisme van CB2-activatie en de stroomafwaartseffecten hiervan in de cel zijn nog onbekend. Wel zijn effecten van activatie van de CB2-receptor op het immuunsysteem beschreven. Deze zijn een ontstekingsremmend effect door het stimuleren van apoptose, remming van proliferatie, onderdrukking van de productie van chemokines en cytokines, en het stimuleren van de regulatoire T-cellen. Ook bevordert de stimulatie van de CB2-receptor de groei en migratie van humane B-cellen. Bij myeloïde cellen bevordert CB2 migratie van de cellen en wordt de neutrofiële differentiatie geblokkeerd.

In dit proefschrift werden de resultaten beschreven van het onderzoek naar de mogelijkheid om de expressie van cannabinoïd-receptor type 2 (CB2) te gebruiken als nieuwe diagnostische en/of prognostische merker bij NHL en AML.

Expressie en functie van de perifere cannabinoïd-receptor

We hebben de CB2-expressie in myeloïde cellen in normaal humaan beenmerg en in primaire AML onderzocht. Het CB2-eiwit was niet aantoonbaar op normale myeloïde voorlopercellen, maar wel zeer frequent aantoonbaar op de AML-blasten. Op een ligandafhankelijke manier induceert de receptor ofwel een blok in neutrofiële differentiatie of abnormale migratie-eigenschappen. Vervolgens hebben we aangetoond dat expressie van de CB2-receptor op normale humane B-cellen in de lymfeklier verschillend is. De mate van expressie lijkt te correleren met de activatiestatus van de receptor. Door gebruik te maken van een antilichaam gericht tegen het N-terminus van de CB2-receptor, hebben we aannemelijk gemaakt dat de B-cellen in het kiemcentrum de geactiveerde CB2-receptor tot expressie brengen. Door gebruik te maken van een antilichaam dat was gericht tegen de C-terminus van de CB2-receptor kon ook aannemelijk worden gemaakt dat de inactieve, niet-gefosforyleerde receptor voornamelijk op

B-cellen voorkomt die liggen in de gebieden buiten het kiemcentrum, namelijk in de mantel- en marginale zone. In een maligne humane B (Raji)-cellijn bleek stimulatie van de CB2-receptor met de endocannabinoïd 2-AG migratie te induceren. Deze migratie werd bovendien versterkt door co-stimulatie met CD40-ligand.

Expressie van de perifere cannabinoïd-receptor in maligne lymfomen en correlatie met eerder beschreven classificatiesystemen

De CB2-expressie bij de verschillende NHL-subtypen werd vervolgens onderzocht. We vonden dat verschillende B-cel- en T-cellymfomen de actieve CB2-receptor tot expressie brachten, terwijl hun normale fysiologische tegenhangers geen actieve CB2-receptor tot expressie brachten. Deze bevindingen wijzen erop dat de CB2-receptor mogelijk aberrant tot expressie wordt gebracht in humane B-cel- en T-cellymfomen. Vervolgens werd de betekenis van het immunohistologische classificatiesysteem volgens Hans et al. in de klinische praktijk onderzocht. Bij patiënten die in 2 gerandomiseerde prospectieve klinische studies waren behandeld met CHOP (cyclofosfamide, doxorubicine, vincristine, prednisolon), konden wij met dit classificatiesysteem geen verschil in prognose aantonen tussen 'germinal center B-cell-like' (GCB)- en non-GCB-subtype DLBCL. Evenzo heeft variëren van de afkappunten in het algoritme dat werd gebruikt voor dit classificatiesysteem geen invloed gehad op de voorspelbaarheid van de prognose. Een waarschijnlijke verklaring voor deze bevindingen is dat er niet-uniforme fixatietechnieken zijn gebruikt in verschillende laboratoria voor de vervaardiging van de paraffineblokjes, waarvan de coupes op de glaasjes zijn gemaakt of van waaruit de puncties voor thermomechanische analyse zijn genomen. Dit pleit voor verdere standaardisatie van deze technieken.

De prognostische waarde van CB2-expressie op maligne lymfomen

De klinisch voorspellende waarde van CB2-expressie werd door middel van immunohistochemische technieken onderzocht. Om de effecten van de verschillende fixatie- en weefselbewerkingstechnieken

Aanwijzingen voor de praktijk

1. De perifere cannabinoïdreceptor is een nog vrij onbekende receptor die voorkomt op de cellen van ons afweersysteem. Er is zeer weinig bekend over de functie van deze receptor. De receptor lijkt een belangrijke immuunmodulatoire functie te hebben.
2. Voor het eerst is beschreven dat deze receptor een aberrant expressiepatroon lijkt te hebben bij hematologische maligniteiten. In diermodellen en cellijnen leidt overexpressie tot het ontstaan van hematologische maligniteiten. Voorts is gebleken dat na toediening van cannabinoïdliganden aan tumorcellen onder andere apoptose kan optreden. Daarom dient verder onderzoek te worden gedaan naar de functie en toepassing van deze receptor in de klinische praktijk om nieuwe behandelingsmodaliteiten te ontwikkelen.
3. In dit proefschrift is retrospectief de prognostische waarde van deze relatief onbekende receptor onderzocht bij het diffuus grootcellig B-non-hodgkinlymfoom (NHL). Meer studies zouden moeten worden uitgevoerd om de klinische relevantie van deze receptor vast te stellen.
4. Verder is gebleken dat de immunohistochemische classificatiesystemen, ontwikkeld aan de hand van 'gene-expression-profiling'-studies bij het diffuus grootcellig B-NHL (GCB- vs. ABC-fenotype) niet altijd goed reproduceerbaar zijn en verder moeten worden verfijnd.

te minimaliseren, hebben we gebruik gemaakt van weefselmateriaal dat in 1 laboratorium was bewerkt. De patiënten van deze retrospectieve studie hebben een anthracycline bevattende chemotherapie ontvangen. Het al dan niet tot expressie komen van de CB2-receptor bleek niet voorspellend te zijn voor de prognose. Overigens bleek in deze studie de subclassificatie in GCB en non-GCB wel prognostisch van belang te zijn. Wij konden geen correlatie aantonen tussen expressie van de CB2-receptor en de prognose bij NHL. We hebben wel aannemelijk gemaakt dat NHL en AML deze receptor aberrant tot expressie brengen.

Conclusie

De CB2-receptor komt voor op normale B-cellen en in mindere mate op de overige celtypen van het immuunsysteem. De receptor wordt aberrant tot expressie gebracht bij NHL en AML. De expressie van de receptor is niet gecorreleerd met een betere prognose in een bepaald type NHL, het DLBCL. Eveneens is er geen correlatie aangetoond met een bestaand classificatiesysteem van dit type lymfoom. Gezien het aberrante expressiepatroon bij NHL en AML, is er een aangrijpingspunt voor de verdere ontwikkeling van op maat gemaakte behandelingen

van deze maligniteiten. Deze worden momenteel in preklinische studies getest.

Referenties

1. Carayon PJ, Marchand D, Dussossoy JM, et al. Modulation and functional involvement of CB2 peripheral cannabinoid receptors during B-cell differentiation. *Blood* 1998;92:3605-15.
2. Rayman N, Lam KH, Laman JD, et al. Distinct expression profiles of the peripheral cannabinoid receptor in lymphoid tissues depending on receptor activation status. *J Immunol* 2004;172:2111-7.
3. Alberich Jordà M, Rayman N, Tas M, et al. The peripheral cannabinoid receptor Cb2, frequently expressed on AML blasts, either induces a neutrophilic differentiation block or confers abnormal migration properties in a ligand-dependent manner. *Blood* 2004;104(2):526-34. Erratum in: *Blood* 2004;104(5):1252.
4. Rayman N, Lam KH, Van Leeuwen J, et al. The expression of the peripheral cannabinoid receptor on cells of the immune system and non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2007;48(7):1389-99.
5. Rayman N, Lam KH, Van der Holt B, et al. Prognostic relevance of immunohistochemical sub classification of diffuse large B-cell lymphoma's in two prospective phase III clinical trials. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011;11:23-32.
6. Rayman N, Lam KH, Van der Holt B, et al. The expression of the peripheral cannabinoid receptor CB2 has no effect on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma's. *Eur J Haematol* 2011;86:466-78.

Ontvangen 8 oktober 2012, geaccepteerd 31 oktober 2012.