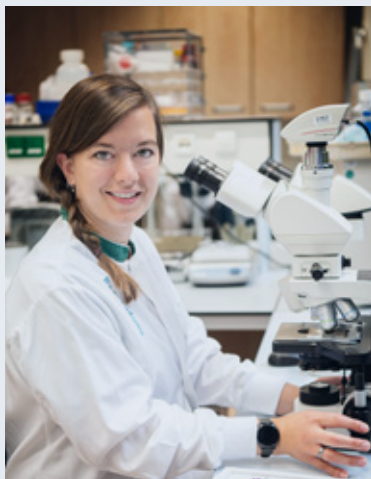


Build Bridges to Break Barriers Using quantitative imaging to understand pancreas tumor biology



E. Markus-Smeets, PhD

Januari 31, 2025
Radboud Universiteit Nijmegen

Promotores:

Prof. M. Gotthardt, MD, PhD
F. Ciampi, PhD

Co-promotores:

E.H.J.G. Aarntzen, MD, PhD
S.A.M. van Lith, PhD

In dit proefschrift staat pancreas ductaal adenocarcinoom (PDAC) centraal. Patiënten met PDAC hebben een slechte prognose. Dit wordt veroorzaakt door: late diagnose, de chirurgisch ingewikkelde locatie van de alvleesklier en de vele verschillende stofwisselingstypes die bestaan en geassocieerd zijn met therapie resistentie. Daarnaast heeft PDAC een uitgebreid tumorstroma, dat de toegankelijkheid door therapieën zoals chemotherapie belemmert. In PDAC zijn er twee subtypes geïdentificeerd, namelijk 'klassiek' en 'quasi-mesenchymaal',

waarvan de laatste een slechtere prognose heeft. Deze twee subtypes worden gekenmerkt door een verschillende stofwisseling. Voor PDAC is de kennis over deze tumortypes en de meest efficiënte behandeling beperkt. Daarom is het noodzakelijk dat er nieuwe diagnostische en therapeutische strategieën worden ontwikkeld.

Dit proefschrift heeft twee belangrijke doelstellingen. Ten eerste is het doel om barrières te doorbreken door biologie, kwantitatieve beeldanalyse en AI te combineren, waardoor we meer kennis verkrijgen van PDAC en waardoor we het verschil in biologie kunnen voorspellen. Dit doen we door de ontwikkeling van een nieuwe methodologie voor het bestuderen van PDAC met behulp van PET scans. Het tweede doel is het ontwikkelen van innovatieve behandelingen gericht op het verstoren van de stromale barrière en het toegankelijker maken van tumoren voor de standaardtherapieën.

Deel 1: Identificatie van metabole subtype bij PDAC

Het identificeren van verschillende subtypes van PDAC kan de behandelingsopties verbeteren. Vanwege de moeilijke anatomische locatie zou een niet-invasieve methode, zoals een PET scan, voordelig zijn voor subtype-identificatie. Om de suikerstofwisseling te visualiseren maken we gebruik van de [^{18}F]FDG-PET scan. In de afgelopen tijd is er een groeiend scala aan beeldanalysesoftware beschikbaar gekomen waarmee we informatie halen uit PET scans. Een van de vaak gebruikte technieken zijn

texture features voor het beschrijven van het PET signaal. Het is echter bekend dat deze texture features kunnen worden beïnvloed door de ademhalingsbewegingen. We hebben het effect ademhaling op de texture features gemeten. We vergeleken de texture features uit de standaard scans met scans die gecorrigeerd waren voor de ademhaling. Onze resultaten tonen aan dat het corrigeren voor ademhalingsbewegingen een significante invloed heeft op de kwantificering van metabole texture features. Bij de interpretatie van texture features moet hier rekening mee worden gehouden.

Identificatie van PDAC subtypen met behulp van [^{18}F]FDG-PET en immunohistochemie

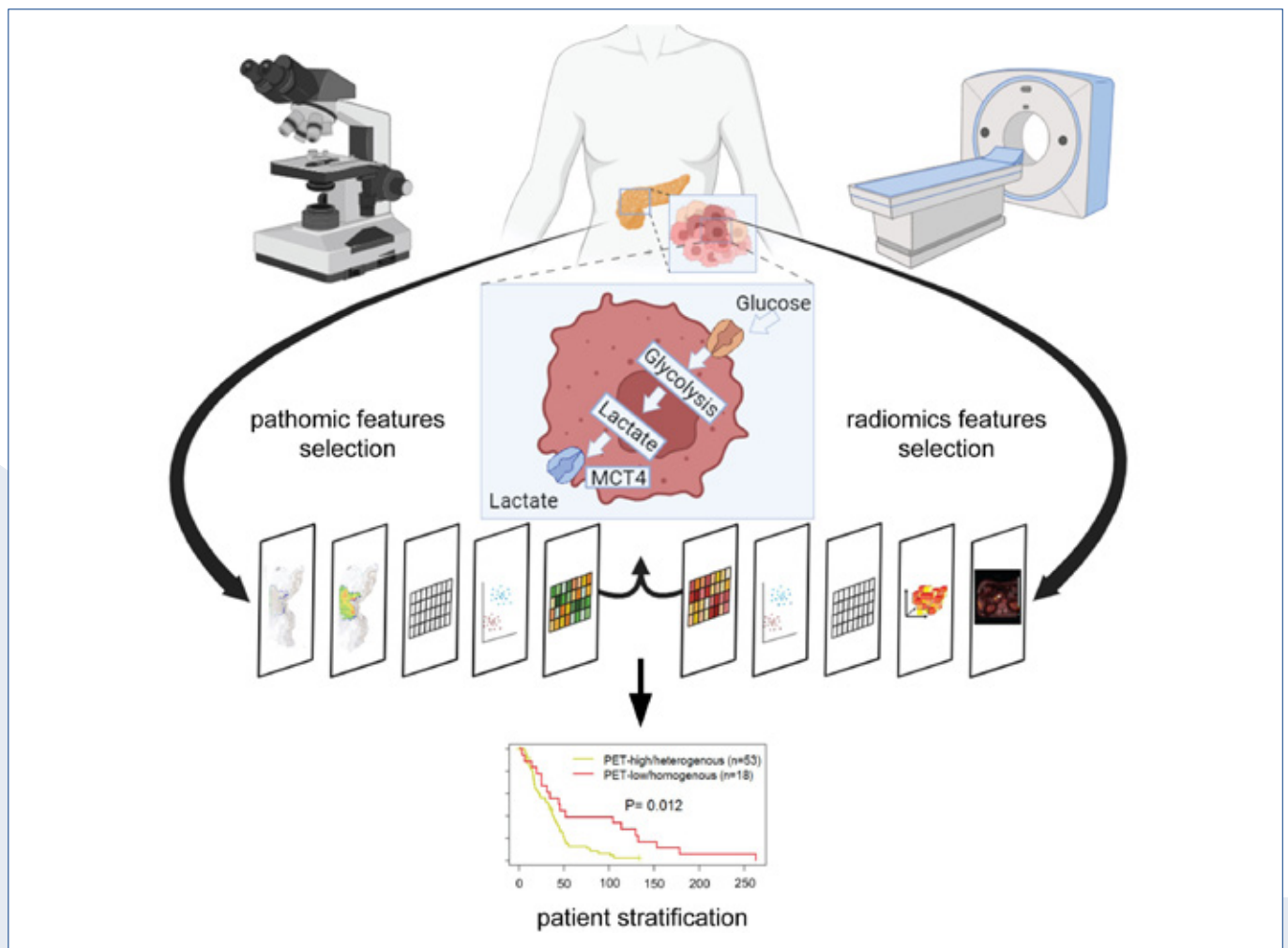
Er is veel onderzoek gedaan naar de voorspellende waarde van texture features. Echter, het ontbreken van een duidelijke biologische basis van deze texture features wordt beschouwd als een obstakel voor verdere klinische implementatie. Om dit probleem aan te pakken hebben we een beeldanalysemethode ontwikkeld die [^{18}F]FDG-PET koppelt aan een biologische rationale op basis van immunohistochemie (figuur 1). Bij immunohistochemie kleuren we de MCT4, een lactaat transporter in het weefsel aan. Lactaat kan een eindproduct zijn in de suikerstofwisseling en wordt vaak gebruikt als bepalende factor voor de snelheid van tumor suikerstofwisseling. Daarna visualiseerden we de verdeling van MCT4 met behulp van gedigitaliseerde microscopische beelden. Ook uit deze beelden

konden we pathologische texture features halen. Op basis van deze texture features definieerden we twee verschillende patronen van MCT4-expressie met behulp van kunstmatige intelligentie. Ten tweede, uit de PET scans van dezelfde patiënten, haalden we de PET-texture features. Deze kenmerken maakten het mogelijk subgroepen van alveesklierkankerpatiënten met hoge en heterogene lactaat transporter te identificeren. Daarna hebben we in een onafhankelijk cohort deze specifieke

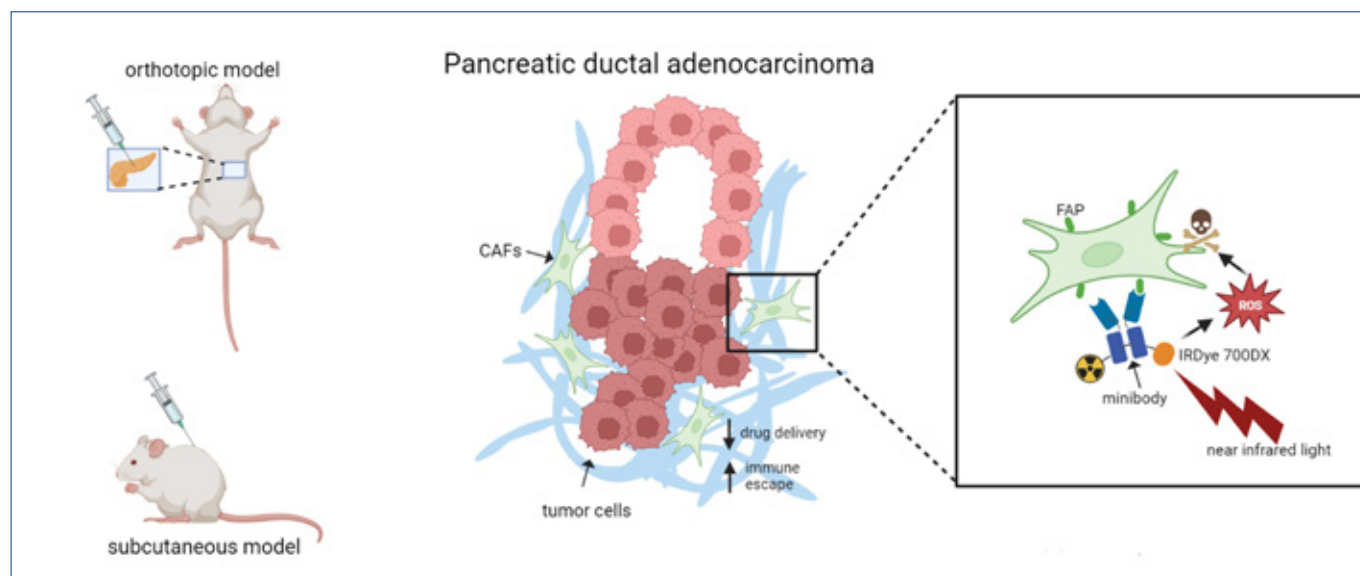
PET-texture features onderzocht. We hebben deze patiënten op basis van de specifieke PET-texture features in twee groepen verdeeld, waarbij we een groep patiënten hebben geïdentificeerd met een slechtere prognose.

Alveesklierkanker wordt gekenmerkt door een uitgebreid stroma, wat een aanzienlijke invloed heeft op de tumor stofwisseling door belemmering van toevoer van voedingsstoffen. Geactiveerde kanker-geassocieerde

(CAFs) spelen een cruciale rol bij het produceren van het stroma door collageenvezels te vormen. De hoeveelheid collageen is niet gecorreleerd aan de hoeveelheid CAFs. Andere onderzoekers hebben dit onderzocht en hebben de geactiveerde stroma-index (ASI) ontwikkeld om de aanwezigheid van CAFs te meten ten opzichte van de hoeveelheid collageen. Dit hebben ze gedaan met behulp van immunohistochemie. CAFs en ook het stroma hebben invloed



Figuur 1. Schematische weergave van de beeldanalysemethode, waarbij ^{18}F FDG-PET wordt gekoppeld aan een biologische rationale op basis van immunohistochemie. Op basis van de verdeling van lactaattransporters worden pathologische texture features geëxtraheerd. Met behulp van kunstmatige intelligentie worden twee subtypen geïdentificeerd. Parallel hieraan worden ^{18}F FDG-PET scans van dezelfde patiënten geanalyseerd om radiomische texture features te extraheren. Vervolgens worden deze features geselecteerd om de subgroepen, zoals bepaald via immunohistochemie, te kunnen voorspellen.



Figuur 2. Schematische weergave van het principe van FAP-gerichte fotodynamische therapie in PDAC-muismodellen. Een FAP-gerichte minibody of antilichaam, gekoppeld aan een fotosensitizer, bindt specifiek aan FAP op het oppervlak van kanker-geassocieerde fibroblasten (CAFs). Na blootstelling aan licht met een golflengte van 690 nm wordt de fotosensitizer geactiveerd, wat leidt tot de productie van reactieve oxygen species (ROS). Deze ROS veroorzaken gerichte celdood in de CAFs.

op de tumorinfiltratie van immuun cellen. Immuun cellen spelen een belangrijke rol in de herkenning en het opruimen van tumoren. De grote hoeveelheid stroma is een van de belangrijkste uitdagingen bij PDAC. Het begrijpen van de impact van stroma op de tumor stofwisseling en de infiltratie van immuun cellen is cruciaal voor het ontwikkelen van effectieve behandelingen. Hoewel CAFs een belangrijke rol spelen bij het produceren van de stroma, is de correlatie tussen hun aanwezigheid en collageenvezels niet eenduidig. We onderzochten met behulp van beeldanalyse van immunohistochemie kleuringen of variatie op basis van ASI-scores gecorreleerd is met de infiltratie van immuun cellen. We onderzochten verschillende gebieden met verschillende ASI-scores. We hebben geen correlatie gevonden tussen ASI-scores en infiltratie van immuun cellen, maar we hebben wel een correlatie waargenomen tussen collageen intensiteit en infiltratie van immuun cellen. Omdat deze studie echter op een kleine groep is uitgevoerd, is verder onderzoek noodzakelijk.

Deel 2: Behandelingsopties bij PDAC; doorbreek de barrière

In het tweede deel van dit proefschrift hebben we een nieuwe behandelmogelijkheid, genaamd fotodynamische therapie, om de CAFs te doden onderzocht. Hierbij hebben we gebruik gemaakt van een antilichaam dat bindt aan fibroblast activation protein (FAP) dat tot expressie komt op CAFs (figuur 2). Aan dit antilichaam hebben we een fotosensitizer gekoppeld die reactieve oxygen species produceert na blootstelling aan licht, die ervoor zorgen dat de CAFs doodgaan. Ons doel is hiermee de tumoromgeving dusdanig te veranderen dat de tumor weer toegankelijk is voor standaardbehandelingen. We hebben zowel een antilichaam en een minibody getest, waarbij de minibody door zijn grootte in theorie beter in het dichte stroma van de tumor kan penetreren. Wij hebben ten eerste laten zien dat zowel het antilichaam als het minibody celdood veroorzaken na activatie met licht, met behulp van celkweek in het lab. Daarnaast hebben wij het

antilichaam en het minibody getest in drie verschillende diersmodellen; een muismodel dat spontaan alvleesklier tumoren ontwikkelt, een muismodel waarbij we tumorcellen onder de huid hebben ingespoten, en een muismodel waarbij we tumorcellen in de alvleesklier hebben ingespoten. Wij hebben aangetoond dat beide moleculen specifiek naar het stroma van deze tumoren gaan in de drie verschillende modellen, en dat cellen in de tumor beschadigd worden en doodgaan na blootstelling aan licht.

Conclusie

Deze scriptie behandelt veelzijdige uitdagingen op het gebied van onderzoek naar alvleesklierkanker. Het benadrukt het potentieel van interdisciplinaire samenwerking en innovatief denken bij het aanpakken van de uitdagingen die PDAC met zich meebrengt. Het ontrafelen van de complexiteiten van tumorbiologie met behulp van kwantitatieve beeldanalyse, en het uitvinden van nieuwe therapeutische strategieën, luiden een nieuw tijdperk in van precisiegeneeskunde voor deze ziekte. ♦