

## STAND VAN ZAKEN

## Exosomen en kanker

Jeroen de Vrij, S.L.N. (Niek) Maas, Joost P. Hegmans, Martine L. Lamfers, Clemens M.F. Dirven en Marika L.D. Broekman

- Exosomen zijn blaasjes van 50-100 nm die worden uitgescheiden door gezonde lichaamscellen, maar ook door neoplastische cellen.
- Preklinische studies hebben laten zien dat exosomen afkomstig van tumorcellen een rol spelen bij tumorprogressie, voornamelijk door het overbrengen van RNA en eiwitten naar andere cellen.
- Door deze overdracht van RNA en eiwitten lijken tumorexosomen de angiogenese te stimuleren en immuuncellen te onderdrukken; exosomen van gezonde immuuncellen daarentegen lijken juist antitumoreigenschappen te bezitten.
- Het karakteriseren van de RNA- of eiwitinhoud van tumorexosomen zou diagnostische of prognostische waarde kunnen hebben, onder andere bij hersentumoren.
- Op exosomen zouden antikankertherapieën gebaseerd kunnen worden, bijvoorbeeld door de vorming van tumorexosomen te blokkeren of door exosomen op specifieke plaatsen therapeutica te laten afgeven.
- De meest vergevorderde toepassing is het gebruik van exosomen van dendritische cellen bij tumorvaccinatie; de veiligheid hiervan is aangetoond in fase I-studies.

Exosomen zijn blaasjes met een diameter van 50 tot 100 nm die worden uitgescheiden door een grote verscheidenheid aan cellen in het menselijk lichaam.<sup>1</sup> Ze ontstaan in de cellen via een complex mechanisme, waarbij celinhoud zoals eiwitten en RNA-strengen in de blaasjes wordt ingekapseld (figuur 1). Door dit mechanisme verschillen ze van andere uitgescheiden blaasjes, zoals 'membraanblebs'.

Lange tijd werd gedacht dat exosomen slechts fungeren als een soort afvalvat voor cellen, die via de exosomen overtollige eiwitten uitscheiden. Inmiddels laten vele studies zien dat exosomen een rol spelen in de onderlinge communicatie van cellen, de presentatie van antigenen, celgroei, maligne transformatie en andere pathologische processen.<sup>2</sup> Exosomen lijken belangrijke communicatiefuncties in het menselijk lichaam te hebben. Voorbeelden zijn de interacties tussen immuuncellen en de onderdrukking van immunologische afweer gericht tegen de foetus; dit laatste gebeurt via de uitscheiding van exosomen door de placenta.<sup>2</sup>

Ook verschillende pathogenen zijn in staat exosomen te gebruiken of zelfs te misbruiken. Zo 'kaapt' hiv de exosomale productieroute door gebruik te maken van exosomale componenten voor zijn opbouw. Het cytomegalovirus (CMV) gebruikt exosomen voor de overdracht van eiwitten en mRNA. Bovendien zijn verschillende mycobacteriën in staat om de exosoomuitscheiding door de gastheercellen te beïnvloeden, wat een verminderde immunrespons tot gevolg heeft.<sup>2</sup>

Het onderzoek naar exosomen die van tumoren afkomstig zijn ('tumour-derived exosomes') is de laatste jaren

*Erasmus Medisch Centrum, Rotterdam.*

*Afd. Neurochirurgie: J. de Vrij, MSc, wetenschappelijk onderzoeker (tevens:*

*Universitair Medisch Centrum Utrecht,*

*afd. Neurochirurgie, en Rudolf Magnus Instituut voor Neurowetenschappen, Utrecht);*

*dr. M.L. Lamfers, wetenschappelijk onderzoeker; prof.dr. C.M.F. Dirven, neurochirurg.*

*Afd. Longziekten: dr. J.P. Hegmans, wetenschappelijk onderzoeker.*

*Universitair Medisch Centrum Utrecht, afd. Neurochirurgie, Utrecht.*

*S.L.N. Maas, semi-arts (tevens: Rudolf Magnus Instituut voor Neurowetenschappen, Utrecht, en Erasmus Medisch Centrum, afd. Neurochirurgie,*

*Rotterdam); dr. M.L.D. Broekman, aios*

*neurochirurgie/wetenschappelijk onderzoeker*

*(tevens: Rudolf Magnus Instituut voor Neurowetenschappen, Utrecht)*

*Contactpersoon: dr. M.L.D. Broekman*

*(m.l.d.broekman-4@umcutrecht.nl).*

in een stroomversnelling geraakt, nadat bekend werd dat tumorexosomen in staat zijn om omliggende cellen te modifieren. Dit gebeurt door de overdracht van de inhoud van de tumorexosomen, die tumor-geassocieerde eiwitten en RNA bevat.<sup>3,4</sup> In een groot aantal publicaties wordt een rol van tumorexosomen in de tumorproliferatie beschreven, onder andere via suppressie van de anti-tumor-immuunrespons en via stimulatie van bloedvatvorming.

Deze bevindingen impliceren dat tumoren exosomen uitscheiden die de groei van tumorcellen bevorderen door beïnvloeding van het micromilieu. Daarom wordt op dit moment in preklinisch onderzoek geprobeerd deze kennis te gebruiken voor de ontwikkeling van anti-kankertherapieën. Voorts blijkt de inhoud van tumorexosomen een afspiegeling te zijn van de inhoud van de cel die ze produceert. Deze eigenschap, in combinatie met het gegeven dat exosomen in alle lichaamsvloeistoffen gevonden worden,<sup>1</sup> maakt exosomen in potentie geschikt voor diagnostische doeleinden.

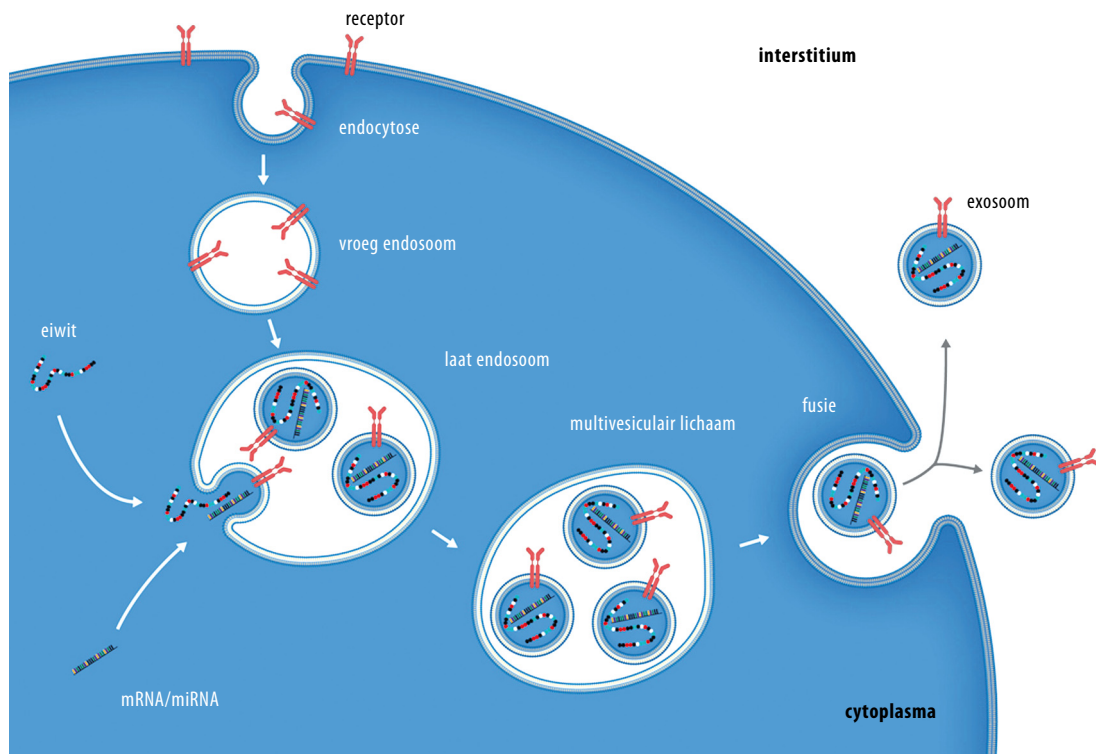
In dit artikel zetten we de huidige kennis over de rol van exosomen in de tumorbiologie uiteen en beschrijven we

hoe deze kennis gebruikt wordt voor onderzoek naar de ontwikkeling van diagnostische middelen en nieuwe therapieën tegen kanker. Wij beschrijven hier alleen studies over exosomen waarin gebruik gemaakt werd van een exosoomspecifieke zuiveringstechniek (daarbij worden de blaasjes gescheiden op basis van dichtheid en/of grootte). Andere typen membraanblaasjes laten wij hier buiten beschouwing.

## EXOSOMEN EN TUMORPROGRESSIE

Tumorexosomen blijken in staat te zijn omliggende tumorcellen of gezonde cellen te beïnvloeden door de overdracht van eiwitten of RNA. Zoals gezegd weerspiegelen tumorexosomen de cytoplasmatische inhoud van de cel waardoor ze geproduceerd worden. Er zijn aanwijzingen dat in sommige gevallen tumorexosomen zelfs verrijkt zijn met celcyclus-regulerende en angiogenese-stimulerende eiwitten en RNA.<sup>3,5</sup>

Een voorbeeld van de invloed van tumorexosomen op omliggende cellen is de overdracht van de oncogene epidermale-groefactorreceptor variant III (EGFRvIII)



**FIGUUR 1** De vorming van exosomen, schematisch weergegeven. Zij ontstaan door de inkapseling van eiwitten en RNA-strengen uit het cytoplasma (miRNA: microRNA; dit zijn RNA-strengen met een lengte van 20-25 nucleotiden). De exosomen worden uitgescheiden door versmelting van multivesiculaire lichaampjes met de celmembraan. (tekening: Niek Maas).

van EGFRvIII-positieve cellen in een glioblastoma multiforme naar EGFRvIII-negatieve cellen. Door deze overdracht gaan de van origine minder agressieve EGFRvIII-negatieve cellen verhoogde oncogene activiteit vertonen.<sup>4</sup>

Tumorexosomen blijken niet alleen andere tumorcellen te beïnvloeden, maar ook omliggend endotheelweefsel. De opname van tumorexosomen door endotheelcellen leidt tot expressie van genen die een rol spelen bij angiogenese.<sup>6</sup> De door tumorexosomen beïnvloede endotheelcellen worden zodoende aangezet tot de vorming van nieuwe bloedvaten, waardoor tumorgroei wordt gestimuleerd. Stimulatie van endotheelcellen door tumorexosomen is beschreven voor onder andere glioom-,<sup>3</sup> melanoom-,<sup>7</sup> en epidermoïdcarcinoom-cellen.<sup>8</sup> Naast deze effecten op endotheelcellen is onlangs beschreven dat tumorexosomen in staat zijn om informatie over te brengen naar fibroblasten.<sup>9</sup> In tumoren zijn fibroblasten de belangrijkste cellen van het bindweefsel, dat verantwoordelijk is voor de synthese van alle elementen van de extracellulaire matrix. Tumorexosomen zorgen voor de differentiatie van fibroblast tot myofibroblast. Dit leidt zeer waarschijnlijk tot tumorprogressie, aangezien myofibroblasten een stimulerend effect hebben op tumorgroei, bloedvatvorming en metastase.<sup>10</sup>

De vraag is of exosomen ook op plaatsen buiten het directe tumormilieu invloed hebben op cellen. In een diermodel is aangetoond dat tumorexosomen een essentiële functie hebben bij metastasering van pancreascarcinoomcellen naar lymfeklieren en longen.<sup>11</sup> Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of exosomen middels overdracht van bepaalde componenten bijdragen aan het ontstaan van 'pre-metastase-niches'.

Eind jaren 90 van de vorige eeuw kwamen exosomen in beeld als antigeen-presenterende entiteiten, nadat gevonden was dat B-cel-exosomen T-cellen kunnen stimuleren via de expressie van een HLA-peptide-complex.<sup>12</sup> Hierdoor werden exosomen aanvankelijk in verband gebracht met stimulatie van een immuunrespons gericht tegen de tumor. Volgens recenter onderzoek lijkt dit effect echter afhankelijk te zijn van het type cel waarvan de exosomen afkomstig zijn. Aan de ene kant lijken exosomen van gezonde immuuncellen, zoals B-cellen en dendritische cellen, een stimulerend effect te hebben. Aan de andere kant lijken tumorexosomen juist een suppressieve werking te hebben.<sup>13,14</sup> Toevoeging van tumorexosomen aan immuuncellen lijkt te zorgen voor het blokkeren van de anti-tumor-immuunrespons, onder andere door het specifiek doden van cytotoxische T-cellen, het activeren van suppressieve regulatoire T-cellen en het blokkeren van de uitrijping van monocytten tot macrofagen.

## EXOSOMEN VOOR DIAGNOSTIEK EN BEHANDELING VAN KANKER

De genoemde bevindingen, die wijzen op een rol voor exosomen bij kanker, waren aanleiding voor onderzoek naar nieuwe vormen van diagnostiek en behandeling van kanker. Hier bespreken wij de ontwikkelingen op deze twee gebieden.

### TUMORDIAGNOSTIEK

Karakterisering van exosomen uit lichaamsvloeistoffen van kankerpatiënten kunnen informatie verschaffen over een tumor.<sup>3,15-18</sup> Zo blijkt tumorspecifiek mRNA detecteerbaar te zijn in geïsoleerde exosomen, bijvoorbeeld RNA coderend voor EGFRvIII in exosomen uit het bloed van patiënten met glioblastoma multiforme,<sup>3</sup> of voor prostaatkankerantigeen 3 (PCA3) in exosomen uit de urine van patiënten met prostaatkanker.<sup>17</sup> Ook kunnen in exosomen tumor-geassocieerde eiwitten gemeten worden, zoals claudine 4 bij patiënten met ovariumcarcinoom.<sup>18</sup> Klinische studies naar de diagnostische of prognostische waarde van exosomenprofielen zijn gaande, waaronder een trial bij vrouwen met borstkanker die neoadjuvante chemotherapie krijgen ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov); zoek op NCT01344109).

Daarnaast zal geanalyseerd moeten worden of exosoomdiagnostiek meerwaarde heeft ten opzichte van andere vormen van diagnostiek, zoals niet-invasief beeldvormend onderzoek of de diagnostiek van circulerende tumorcellen, die nog in ontwikkeling is. Mogelijk is de haalbaarheid of de meerwaarde van exosoomdiagnostiek sterk afhankelijk van het type kanker. Zo kunnen bij hersentumoren exosomen waarschijnlijk makkelijker de bloed-hersenbarrière passeren dan tumorcellen, waardoor exosoomdiagnostiek mogelijk meer kans van slagen heeft dan diagnostiek van circulerende tumorcellen.

### ONTWIKKELING VAN NIEUWE ANTINKANKERTHERAPIËN

Gelet op de rol van tumorexosomen in de tumorbiologie wordt onderzocht in hoeverre kankerpatiënten gebaat zijn bij een therapie gericht tegen de effecten van deze exosomen. Deze studies bevinden zich op dit moment in een preklinisch stadium; het onderzoek wordt uitgevoerd in celkweek- en diermodellen. Verder onderzoek, onder andere in diermodellen, zal moeten uitwijzen of klinische studies gerechtvaardigd zijn.

In een muismodel van colorectaalcarcinoom werd recent afname van groei gezien na het blokkeren van tumorexosomen-opname.<sup>19</sup> De blokkade van exosoombinding aan endotheelcellen gaf een vermindering in de dichtheid van tumorbloedvaten, waardoor de tumorgroei geremd werd. Vervolgonderzoek zal moeten uitwijzen wat de nadelige neveneffecten zijn van een therapie waarbij exo-

somen op niet-specifieke wijze worden geblokkeerd. In verband daarmee tracht men stoffen te ontwikkelen die specifiek gericht zijn op tumorexosomen en andere exosomen ongemoeid laten.

Een andere strategie die onderzocht wordt, is het gebruik van therapeutica die aangrijpen op de secretie van tumorexosomen. Diverse middelen zijn inmiddels geïdentificeerd die intracellulair leiden tot blokkering van exosoomvorming.<sup>20</sup>

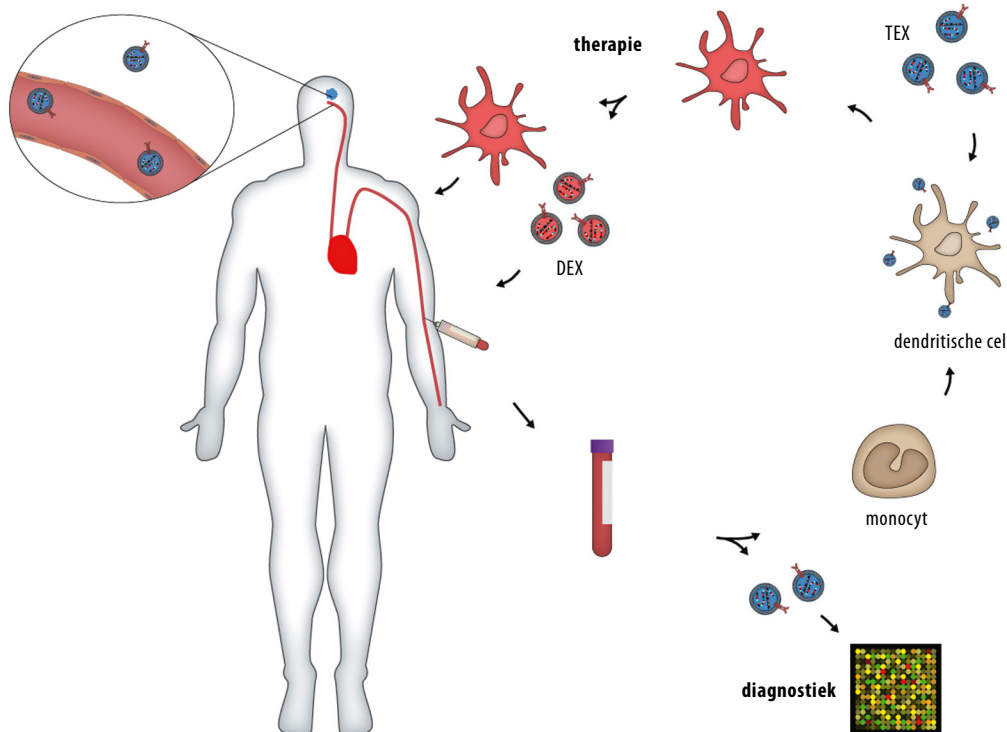
In celweeke modellen vindt nader onderzoek plaats naar de effecten van blokkering van tumorexosomen op de effectiviteit van verscheidene therapeutica. Zo is voor cisplatine-resistente ovariumcarcinoomcellen aangetoond dat zij tumorexosomen met een verhoogde concentratie cisplatine uitscheiden, waardoor de cellen minder gevoelig zijn voor behandeling.<sup>21</sup>

#### TUMORVACCINATIE MET EXOSOMEN VAN DENDRITISCHE CELLEN

De meest vergevorderde ontwikkeling op het gebied van exosoom-gerelateerde antikankertherapie is het gebruik van dendritische-celexosomen (DEX) voor tumorvac-

cinatie. De DEX-tumorvaccinatie is afgeleid van de tumorvaccinatie met dendritische cellen, zoals het prostaatkankervaccin op basis van dendritische cellen ([www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm210174.htm](http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm210174.htm)). Hierbij worden dendritische cellen buiten het lichaam 'opgeladen' met tumorantigenen; deze cellen worden vervolgens toegediend aan een kankerpatiënt om een immunorespons tegen de tumor op te wekken. Bij DEX-tumorvaccinatie worden niet de dendritische cellen, maar de exosomen van deze cellen toegediend (figuur 2).

De veiligheid van DEX-tumorvaccinatie is aangetoond in klinische fase I-studies waarbij DEX werden toegediend aan patiënten met een melanoom of een niet-kleincellig longcarcinoom.<sup>22</sup> Het uiteindelijke doel is om DEX-tumorvaccins te ontwikkelen, die als cel-vrij preparaat kunnen worden bewaard en snel kunnen worden toegediend aan de patiënt. Momenteel loopt er een klinische fase II-studie waarin de anti-tumoreffectiviteit van DEX-tumorvaccinatie onderzocht wordt (trialnummer NCT01159288 op [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).



**FIGUUR 2** Het principe van tumorvaccinatie met exosomen van dendritische cellen. Uit het bloed van een patiënt met bijvoorbeeld een hersentumor kunnen exosomen en monocyten worden geïsoleerd. De exosomen kunnen gebruikt worden voor diagnostische of therapeutische doeleinden. In dit laatste geval laat men de monocyten differentiëren tot dendritische cellen, die vervolgens worden opgeladen met exosomen afkomstig van de hersentumorcellen. Exosomen afkomstig van de opgeladen dendritische cellen kunnen vervolgens worden toegediend aan de patiënt om een immunoreactie tegen de tumor op te wekken. DEX = exosomen afkomstig van dendritische cellen; TEX = exosomen afkomstig van tumorcellen (tekening: Niek Maas).

## EXOSOMEN ALS DRAGER VAN THERAPEUTICA

Exosomen kunnen mogelijk ook gebruikt worden voor het afgeven van therapeutica. Ze zouden hiervoor geschikt kunnen zijn doordat zij minder immunogeen zijn dan afgiftesystemen als virale vectoren en liposomen. Een voorbeeld van deze toepassing is het efficiënt afgeven van een ontstekingsremmer in de hersenen, verpakt in exosomen van immuuncellen. Dit is onderzocht in muizen met een hersentumor.<sup>23</sup> De exosomen en hun inhoud werden specifiek opgenomen in tumor-ondersteunende microgliacellen. Deze cellen stierven vervolgens af, met een verminderde tumorgroei tot gevolg.

Het onderzoek naar 'exosoompackaging' bevindt zich nog in een preklinisch stadium, maar de kennis over deze techniek neemt snel toe. Zo is in muizen aangetoond dat ook RNA kan worden afgeleverd door exosomen, en dat de exosoommembraan gemodificeerd kan worden om de exosomen te richten naar specifieke doelcellen.<sup>24</sup> Verder preklinisch onderzoek zal nodig zijn om vast te stellen of deze techniek potentie heeft voor klinische toepassingen.

## CONCLUSIE

Tumorexosomen lijken een rol te spelen in tumoren, onder andere door interacties met omliggende endotheelcellen en met cellen van het immuunsysteem. Deze bevinding opent wegen voor onderzoek naar nieuwe kankertherapieën. Voorbeelden hiervan zijn het blokkeren van de productie van exosomen door tumorcellen of het gebruik van exosomen in tumorvaccinatiestrategieën.

Naast dit onderzoek naar therapeutische toepassingen heeft de vondst van tumorexosomen in het bloed of urine

- Exosomen zijn blaasjes van 50-100 nm, omgeven door een membraan, die worden uitgescheiden door gezonde cellen en tumorcellen.
- Tumorexosomen zorgen voor functionele overdracht van RNA en eiwitten naar andere cellen.
- Deze overdracht van RNA en eiwitten leidt in celweek- en diermodellen tot stimulatie van angiogenese en immuunsuppressie.
- Immunotherapie van kanker met exosomen uit dendritische cellen was veilig en gaf een antitumorrespons in klinisch fase I-onderzoek.
- Tumorexosomen geïsoleerd uit bloed of urine kunnen in potentie worden toegepast voor diagnostiek en behandeling van kanker.

van patiënten geleid tot veel onderzoek naar diagnostiek gebaseerd op exosomen; deze diagnostiek is bedoeld om op relatief snelle en niet-invasieve wijze informatie te verschaffen over het tumortype of de mate van progressie van kanker.

Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: het instituut waar J. Hegmans werkzaam is ontving financiële ondersteuning van de Stichting Asbestkanker; het instituut waar M. Broekman werkzaam is ontving een Hersenstichting Fellowship en financiële ondersteuning van de Schumacher Kramer Stichting.

Aanvaard op 19 oktober 2011

Citeer als: Ned Tijdschr Geneeskd. 2011;155:A3677

[Meer op www.ntvg.nl/klinischepraktijk](http://www.ntvg.nl/klinischepraktijk)

## LITERATUUR

- 1 Van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem.* 2006;140:13-21.
- 2 Schorey JS, Bhatnagar S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic.* 2008;9:871-81.
- 3 Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 2008;10:1470-6.
- 4 Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2008;10:619-24.
- 5 Hegmans JP, Bard MP, Hemmes A, et al. Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells. *Am J Pathol.* 2004;164:1807-15.
- 6 Nazarenko I, Rana S, Baumann A, et al. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res.* 2010;70:1668-78.
- 7 Hood JL, Pan H, Lanza GM, Wickline SA. Paracrine induction of endothelium by tumor exosomes. *Lab Invest.* 2009;89:1317-28.
- 8 Park JE, Tan HS, Datta A, et al. Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Mol Cell Proteomics.* 2010;9:1085-99.
- 9 Webber J, Steadman R, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res.* 2010;70:9621-9630.
- 10 Shimoda M, Melody KT, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin Cell Dev Biol.* 2010;21:19-25.
- 11 Jung T, Castellana D, Klingbeil P, et al. CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes. *Neoplasia.* 2009;11:1093-105.
- 12 Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med.* 1996;183:1161-72.
- 13 Chapat N, Théry C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol.* 2011;33:419-40.

- 14 Zhang HG, Grizzle WE. Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. *Clin Cancer Res.* 2011;17:959-64.
- 15 Rabinowits G, Gercel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2009;10:42-6.
- 16 Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2008;110:13-21.
- 17 Nilsson J, Skog J, Nordstrand A, et al. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *Br J Cancer.* 2009;100:1603-7.
- 18 Li J, Sherman-Baust CA, Tsai-Turton M, Bristow RE, Roden RB, Morin PJ. Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer. *BMC Cancer.* 2009;9:244.
- 19 Al-Nedawi K, Meehan B, Kerbel RS, Allison AC, Rak J. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:3794-9.
- 20 Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science.* 2008;319:1244-7.
- 21 Safaei R, Larson BJ, Cheng TC, et al. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2005;4:1595-604.
- 22 Tan A, De La Pena H, Seifalian AM. The application of exosomes as a nanoscale cancer vaccine. *Int J Nanomedicine.* 2010;5:889-900.
- 23 Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, et al. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol Ther.* 2011;19:1769-79.
- 24 Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S, Wood MJ. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol.* 2011;29:341-5.