Therapeutische Krebszellen zur Bekämpfung von Tumoren

**Eine Strategie zur Bekämpfung von Krebs ist die Immuntherapie, die darauf abzielt, das körpereigene Immunsystem so zu aktivieren, dass es Krebszellen aufspürt und zerstört. Nun hat eine Forschergruppe von der Harvard Medical School mit gentechnischen Methoden therapeutische Krebszellen (ThTC-Zellen) entwickelt, die in der Lage sind, zellverwandte Tumore im Tiermodell zu eliminieren. Dabei induzieren die ThTC-Zellen Apoptose in den Krebszellen und bewirken die Einwanderung von Immunzellen in das Tumorgewebe. Dadurch kommt es zu einer langfristigen Immunität, wodurch auch die Wiederkehr von Tumoren und das Auftreten von Metastasen unterdrückt werden. Mit dem Nachweis, dass ThTC-Zellen auch menschliche Tumore in humanisierten Mäusen bekämpfen können, steht einer schnellen klinischen Umsetzung dieser zellbasierten Immuntherapie nichts im Wege.**

Krebszellen zur Bekämpfung von bösartigen Tumoren einzusetzen, mag zunächst einmal paradox klingen. Dabei verfolgt dieser Therapieansatz die gleiche Strategie wie die Immunisierung gegen Infektionskrankheiten: Analog zur Impfung bewirkt die Verabreichung von inaktivierten Tumorzellen eine antitumorale Immunantwort, denn die Krebszellen dienen als eine natürliche Quelle von Neoantigenen. Diese neu auftretenden Antigene entstehen durch verschiedene Arten von Mutationen und Gen-Umstrukturierungen im Rahmen der Karzinogenese und sind daher charakteristisch für Krebszellen. Neoantigene stellen somit einen Angriffspunkt für das Immunsystem dar und spielen eine wichtige Rolle bei Krebsimmuntherapien. Allerdings ist die Effektivität einer Immunisierung mit inaktivierten Krebszellen begrenzt, da von ihnen keine direkte zytotoxische Wirkung gegen Tumorzellen ausgeht.

Im Gegensatz zu inaktivierten Krebszellen haben lebende Tumorzellen die Fähigkeit, in Tumoren einzuwandern. Werden die therapeutischen Krebszellen gentechnisch so verändert, dass sie therapeutische Wirkstoffe freisetzen, können sie Tumore direkt vernichten. Ein solcher therapeutischer Wirkstoff ist das Interferon-β (IFN-β), der direkt das Wachstum und die Gefäßneubildung von Tumoren hemmt und indirekt die antitumorale Immunantwort aktiviert. Ein Problem hierbei ist jedoch, dass das produzierte IFN-β einen vorzeitigen Zelltod der gentechnisch-veränderten therapeutischen Krebszellen durch autokrine Toxizität auslösen würde. Zudem muss gewährleistet werden, dass die therapeutischen Krebszellen nicht selbst zu bösartigen Tumoren heranwachsen. Nun hat ein Forscherteam von der Harvard Medical School therapeutische Krebszellen entwickelt, die resistent gegenüber dem Einfluss von INF-β sind (durch Inaktivierung des IFN-β-spezifischen Rezeptors), aber gleichzeitig IFN-β (als therapeutischen Wirkstoff und Immunmodulator) und den Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktor (GMCSF) (als Vermittler zur Rekrutierung, Differenzierung und Vermehrung von Immunzellen) produzieren. Außerdem wurden den therapeutischen Krebszellen Sicherheitssysteme eingebaut, um die Entstehung von ungewollten Sekundärtumoren zu verhindern.

Die Idee von IFN-β und GMCSF produzierenden therapeutischen Krebszellen wurde mit murinen Glioblastomzellen (GBM-Zellen) untersucht. Zunächst wurde das Gen für die wichtige α-Untereinheit des IFN-α/β-Rezeptors mithilfe des CRISPR-Cas9-Verfahrens ausgeknockt. Um die Zellen im weiteren Verlauf der Versuche leichter erkennen zu können, wurden diese noch mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) markiert; diese IFN-β resistenten Zellen wurden als „GFP-TC-Zellen“ bezeichnet. Die GFP-TC-Zellen wurden dann gentechnisch so manipuliert, dass sie IFN-β sezernieren. Gleichzeitig wurde den Zellen das Thymidinkinase-Gen des Herpes-simplex-Virus als Suizid-Gen eingesetzt. Diese IFN-β exprimierenden GFP-TC-Zellen wurden „IFN-β–TC-Zellen“ benannt. Für zusätzliche langfristige immunitätsfördernde Effekte wurden die IFN-β–TC-Zellen gentechnisch dahin verändert, dass sie auch GMCSF ausschütten. Diese bifunktionellen Zellen wurden als „ThTC-Zellen“ gekennzeichnet. Für Kontrollexperimente wurden GFP-TC-Zellen gentechnisch dazu gebracht, ausschließlich GMCSF zu sezernieren. Diese Zellen wurden als „GMCSF-TC-Zellen“ bezeichnet.

Als Erstes wurde untersucht, ob die IFN-β- und/oder GMCSF-sezernierenden Zellen das Wachstum der parentalen IFN-β-sentitiven Glioblastomzellen (GBM-Zellen) *in vitro* hemmen können. Dazu wurden GFP-TC-, IFN-β-TC-, GMCSF-TC- und ThTC-Zellen getrennt mit GBM-Zellen kokultivert, die zum leichteren Nachweis mit einem Luciferase-mCherry-Fusionsprotein (FmC) markiert wurden (GMB-FmC-Zellen). Nur IFN-β-TC- und ThTC-Zellen waren in der Lage, die GMB-FmC-Zellen abzutöten. GFP-TC-Zellen zeigten keine Zytotoxizität und GMCSF-TC-Zellen bewirkten eine erhöhte Zellvermehrung der GMB-FmC-Zellen. Dass die zytotoxische Wirkung der IFN-β-TC- und ThTC-Zellen auf die Freisetzung von INF-β beruhte, konnte mit IFN-β-resistenten GFP-TC-FmC-Zellen nachgewiesen werden. Diese Tumorzellen wurden in Kokulturen mit IFN-β-TC- bzw. ThTC-Zellen nicht zerstört.

Um die Wirkung der IFN-β- und/oder GMCSF-sezernierenden Zellen auf das Tumorwachstum *in vivo* zu bestimmen, wurden diese in Gehirnen von immunkompetenten Mäusen eingepflanzt. Damit das Wachstum von Tumoren mittels Biolumineszenz-Bildgebung verfolgt werden konnte, wurden die gentechnisch hergestellten Zellen noch mit dem Luciferase-mCherry-Fusionsprotein (FmC) markiert. Bei allen Mäusen, denen die parentalen GMB-FmC-Zellen bzw. die GFP-TC-FmC-Zellen eingepflanzt wurden, wuchsen Tumore heran. Bei 50% der Mäuse mit implantierten GMCSF-TC-FmC-Zellen konnten ebenfalls Tumore nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu hatten nur 17% der Mäuse mit eingepflanzten IFN-β-TC-FmC-Zellen nachweisbare Tumore. Dieser Befund zeigt, dass IFN-β eine stärkere Hemmung des Tumorwachstums bewirkt als GMCSF. Beachtenswert ist jedoch, dass bei Mäusen, denen ThTC-FmC-Zellen eingesetzt worden waren, kein Tumorwachstum festgestellt wurde. Dieses Ergebnis zeigt, dass IFN-β und GMCSF additiv bei der Hemmung des Tumorwachstums wirken. Um zu untersuchen, ob IFN-β- und/oder GMCSF-sezernierenden Zellen auch zu einer langfristigen antitumoralen Immunität führt, wurden den überlebenden Mäuse aus den vorherigen Experimenten zwei Monate nach der ersten Zellimplantation parentale GMB-FmC-Zellen in die kontralaterale Gehirnhälfte eingepflanzt. Während bei 40% bzw. 80% der Mäuse mit zuvor implantierten GMCSF-TC-FmC-Zellen bzw. IFN-β-TC-FmC-Zellen keine Tumore wuchsen, blieben 100% der Mäuse mit vormals eingepflanzten ThTC-FmC-Zellen bis zum Versuchsende nach 60 Tagen tumorfrei. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass gentechnisch veränderte Krebszellen, die sowohl IFN-β als auch GMCSF sezernieren, eine langfristige antitumorale Immunität in Mäusen induzieren können.

Als Nächstes wurde der Einfluss des Immunsystems auf die Wachstumshemmung von Krebszellen geprüft. Dazu wurden T-Zell- und B-Zell-defizienten (SCID) Mäusen ThTC-FmC-Zellen eingepflanzt. Da bei allen SCID-Mäusen Tumore festgestellt wurden, kann gefolgert werden, dass die Hemmung des Tumorwachstums durch IFN-β und GMCSF auf T-Zellen und/oder B-Zellen angewiesen ist. Um zu bestimmen, ob T-Zellen oder B-Zellen für die Inhibierung des Tumorwachstums notwendig sind, wurden T-Zell-defizienten (athymischen) Mäusen ThTC-FmC-Zellen implantiert. Da auch bei allen athymischen Mäusen Tumore beobachtete wurden, kann geschlossen werden, dass T-Zellen essenziell für die Hemmung des Tumorwachstums sind. Weitere Versuche zeigten, dass sowohl CD4+- als auch CD8+-T-Zellen an der Tumorwachstumshemmung beteiligt sind. Das durch die ThTC-Zellen vermittelte immunologische Gedächtnis konnte jedoch hauptsächlich auf CD4+-T-Zellen zurückgeführt werden.

Um die therapeutische Wirkung der ThTC-Zellen im klinischen Kontext bewerten zu können, wurden etablierte Gehirntumore bei Mäusen chirurgisch entfernt und in der Resektionshöhle gentechnisch veränderte Krebszellen zusammen mit einer auf Hyaluronsäure basierenden synthetischen extrazellulären Matrix (sEZM) eingebracht. Bei allen Mäusen, die nach der Tumorentfernung mit GFP-TC-, IFN-β-TC-, GMCSF-Zellen oder nur mit sEZM behandelt wurden, wuchsen innerhalb von wenigen Tagen neue Tumore heran. Im Gegensatz dazu wuchsen nur bei 17% der Mäuse nach Behandlung mit ThTC-Zellen noch Tumore. Zudem war die mediane Überlebenszeit der ThTC-behandelten Mäuse signifikant länger als die der GFP-TC-, IFN-β-TC-, GMCSF-behandelten Mäuse. Weitere Untersuchungen zeigten, dass nach der chirurgischen Tumorentfernung im zurückgebliebenen Tumorgewebe bei den ThTC-behandelten Mäuse zahlreiche apoptotische Zellen vorhanden waren. Dies deutet darauf hin, dass ThTC-Zellen in der Lage sind, Apoptose in Tumorzellen auszulösen. Auch konnte gezeigt werden, dass die ThTC-Zellen eine langfristige antitumorale Immunität nach Eliminierung der restlichen Tumorzellen in der Resektionshöhle bewirken, denn nach Implantierung von GMB-FmC-Zellen in der kontralateralen Gehirnhälfte der überlebenden Mäuse wurde kein Tumorwachstum beobachtet. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ThTC-Zellen *in vivo* direkt zytotoxisch auf Tumorzellen wirken und diese effektiv eliminieren können und zudem eine adaptive antitumorale Immunität induzieren.

Zur genaueren Beurteilung der immunmodulatorischen Wirkung der ThTC-Zellen im Resektionsmodell wurden Tumorgewebeproben fünf Tage nach der Behandlung mit gentechnisch veränderten Zellen mittels mehrfarbiger Durchflusszytometrie analysiert. Verglichen mit sEZM- und GFP-TC-behandelten Mäusen zeigten die Tumorgewebeproben der ThTC-behandelten Mäuse eine deutlich erhöhte Einwanderung von Leukozyten, dendritischen Zellen und T-Zellen. Dieses Ergebnis kann dahin interpretiert werden, dass ThTC-Zellen eine erhöhte Neoantigenpräsentation im Tumorgewebe durch Rekrutierung von antigenpräsentierenden Zellen induzieren. Zudem zeigten weiterführenden Analysen, dass die in der Resektionshöhle eingebrachten ThTC-Zellen die Tumormikroumgebung von einer immunhemmenden in eine immunstimulierende umwandeln.

Temozolomid (TMZ) ist ein Krebsmittel zur Behandlung von erstdiagnostizierten bösartigen Gehirntumoren (Glioblastomen). Allerdings entwickelt sich im Laufe der Therapie häufig eine Resistenz gegen das Medikament. Um zu untersuchen, ob ThTC-Zellen auch gegen TMZ-resistente Glioblastome wirken, wurde von den parentalen GMB-FmC-Zellen eine TMZ-resistente [rezidivierend](https://www.linguee.com/german-english/translation/rezidivierend.html)e GMB-Zelllinie (rrGMB-Zellen) etabliert. Die therapeutische Wirksamkeit der ThTC-Zellen gegenüber rrGBM-Zellen wurde wieder mit dem Resektionsmodell bestimmt. Nach chirurgischer Entfernung des rrGBM-Tumors wurde in der Resektionshöhle die gentechnisch veränderten Zellen implantiert. Bei Mäusen, die nur mit sEZM oder mit GFP-TC-Zellen behandelt wurden, kehrte der rrGBM-Tumor nach wenigen Tagen wieder zurück. Bei 70% der Mäuse, die mit ThTC-Zellen therapiert wurden, wurden die restlichen rrGMB-Zellen in der Resektionshöhle vollständig vernichtet. Diese Beobachtung zeigt, dass ThTC-Zellen in der Lage sind, auch chemotherapieresistente Krebszellen effektiv zu bekämpfen und so das Wiederkehren des Tumors verhindern können.

Zur Beantwortung der Frage, ob das Verfahren auch auf andere Krebsarten angewendet werden kann, wurden entsprechende ThTC-Zellen von Lewis-Lungen-Karzinom-Zellen (LLC-ThTC-Zellen) und B16-Melanom-Zellen (B16-ThTC-Zellen) erzeugt. Für beide therapeutischen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass sie eine antitumorale Immunität induzieren und das Wachstum entsprechender Tumore in Mäusen verhindern. Ferner wurde gefunden, dass LLC-ThTC-Zellen ebenfalls ein langfristiges immunologisches Gedächtnis vermitteln und die Bildung von Metastasen unterdrücken. Wie die GBM-ThTC-Zellen, konnten die LLC-ThTC-Zellen im Resektionsmodell übrig gebliebene Tumorzellen in der Restriktionshöhle vollständig vernichten. Wurden den überlebenden Mäusen erneut die parentalen Krebszellen eingepflanzt, so wurde kein Tumorwachstum beobachtet. All diese Versuchsergebnisse zeigen, dass das mit den GBM-Zellen entwickelte Verfahren auch bei anderen Krebszelllinien funktioniert.

Wie bereits oben erwähnt, wurden aus Sicherheitsgründen den therapeutischen Krebszellen das Thymidinkinase-Gen des Herpes-simplex-Virus (HSV) als Suizid-Gen einkloniert. Zur Testung des Sicherheitssystems wurden immundefiziente SCID-Mäuse, denen ThTC-FmC-Zellen eingepflanzt worden waren, mit Ganciclovir behandelt. Ganciclovir ist ein [Analogon](https://de.wikipedia.org/wiki/Analogon_%28Chemie%29) der [Nukleinbase](https://de.wikipedia.org/wiki/Nukleinbasen) [Guanin](https://de.wikipedia.org/wiki/Guanin) und wird von der HSV-Thymidinkinase zum entsprechenden Monophosphat und anschließend von zellulären Kinasen zum Triphosphat umgewandelt. Beim Einbau des synthetischen [Nukleosid-Analogon](https://de.wikipedia.org/wiki/Nukleosid-Analogon)s in die [DNA](https://de.wikipedia.org/wiki/Desoxyribonukleins%C3%A4ure) der Krebszellen kommt es zum Kettenabbruch während der DNA-Synthese, und die Krebszellen können sich nicht mehr vermehren. Im Gegensatz zu unbehandelten SCID-Mäusen nahm das Biolumineszenzsignal in Ganciclovir-behandelten SCID-Mäusen innerhalb von wenigen Tagen deutlich ab. Dieses Ergebnis belegt die Effektivität des Suizid-Gens in therapeutischen Krebszellen.

Um die bisherigen Erkenntnisse auf Krebspatienten übertragen zu können, wurden menschliche ThTC-Zellen (hThTC-Zellen) aus zwei etablierten menschlichen GBM-Zelllinien und aus zwei von Patienten abstammenden GBM-Zellen erzeugt. Eine dosisabhängige Zytotoxizität gegenüber ihren jeweiligen Ausgangszellen wurde für alle vier hThTC-Zellen in Kokultivierungsexperimenten gefunden. Um die therapeutische Effektivität der hThTC-Zellen in einer menschlichen Immunumgebung *in vivo* zu bestimmen, wurden diese in humanisierten BLT-Mäusen getestet. BLT-Mäuse enthalten menschliche hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark, in der Leber und im Thymus. Nachdem den BLT-Mäusen etablierte menschliche GBM-Tumore chirurgisch entfernt worden waren, wurden in den Resektionshöhlen hThTC-Zellen implantiert. Im Gegensatz zur sEZM-Kontrolle, wurde bei Mäusen mit eingepflanzten hThTC-Zellen kein Wachstum der nach der Resektion übrig gebliebenen GBM-Zellen beobachtet. Zudem überlebten die hThTC-behandelten Mäuse deutlich länger als die sEZM-behandelten Tiere. Diese Ergebnisse deuten an, dass ein auf therapeutischen Krebszellen basierendes Behandlungsverfahren auch im Menschen funktionieren sollte.

Die im Rahmen der hier besprochenen Studie durchgeführten Experimente haben auf eindrucksvoller Weise dargelegt, dass ein auf Krebszellen basierendes therapeutisches Verfahren Tumorzellen direkt angreifen und diese durch einen immunvermittelten Zelltod vernichten (Abb.). Darüber hinaus bewirkt das Verfahren eine langlebige Immunität, die das Fortschreiten und Wiederauftreten von Tumoren verhindert. Ferner wurde gezeigt, dass therapeutische Krebszellen das Potenzial haben, auch Tumore und Metastasen in Patienten bekämpfen zu können. Es ist seht gut vorstellbar, dass therapeutische Krebszellen sich im Rahmen einer stratifizierten Medizin als eine auf Patienten zugeschnittene Therapie entwickeln werden und so das Behandlungsergebnis bei Krebspatienten deutlich verbessern können.

[K.-S. Chen et al., Sci. Transl. Med. **15**, eabo4778 (2023)].

*PD Dr. Dietmar Steverding, Norwich, England*



**Abb.** Schematische Darstellung der Herstellung und Wirkungsweise therapeutischer Krebszellen. Mittels der CRISPR-Methode wurde der IFN-α/β-Rezeptor von Krebszellen inaktiviert. Anschließend wurden die Zellen gentechnisch so verändert, dass sie IFN-β und GMCSF sezernieren. Zudem wurde das Thymidinkinase-Gen des Herpes-simplex-Virus (HSV-TK) in die Zellen eingebracht. Das von diesen therapeutischen Krebszellen ausgeschüttete IFN-β greift als zytotoxischer Wirkstoff die parentalen Tumorzellen direkt an. Das sezernierte GMCSF vermittelt die Rekrutierung von Immunzellen und modelliert die Immunantwort gegen die Tumorzellen. Durch die konzertierte Aktion von IFN-β und GMCSF werden die anvisierten Tumorzellen vernichtet. Die therapeutischen Krebszellen können mit dem antiviralen Wirkstoff Ganciclovir zerstört werden. [Abb. D. Steverding, verändert nach Chen et al.]