

# Leukemische stamcellen en meetbare restziekte bij AML: een nieuwe uitkomstparameter

Leukemic stem cells and measurable residual disease in AML: an emerging new outcome parameter

dr. W. Zeijlemaker

## SAMENVATTING

Op 22 november 2017 promoveerde Wendelien Zeijlemaker aan de Vrije Universiteit van Amsterdam op haar promotieonderzoek getiteld 'Leukemic stem cells and measurable residual disease in AML: an emerging new outcome parameter', onder begeleiding van promotor prof. dr. G.J. Ossenkoppele en copromotor dr. G.J. Schuurhuis. In deze bespreking worden de belangrijkste bevindingen van het onderzoek weergegeven.

(NED TIJDSCHR HEMATOL 2018;15:416-20)

## SUMMARY

On November 22<sup>nd</sup>, 2017, Wendelien Zeijlemaker was promoted at the VU University Medical Center in Amsterdam on her PhD thesis entitled 'Leukemic stem cells and measurable residual disease in AML: an emerging new outcome parameter', under supervision of prof. G.J. Ossenkoppele, PhD, and G.J. Schuurhuis, PhD. In this report the most important findings of this thesis are summarized.

## INLEIDING

Bij acute myeloïde leukemie (AML) treden mutaties op in myeloïde blasten waardoor deze cellen ongecontroleerd kunnen prolifereren. Door accumulatie van blasten in het beenmerg gaat AML vaak gepaard met een pancytopenie, waarbij snelle behandeling met chemotherapie noodzakelijk is om verdere deling van leukemiecellen te stoppen. De behandeling van AML bestaat uit hoge dosis chemotherapie, veelal gevolgd door een autologe of allogene stamceltransplantatie. Van de patiënten <60 jaar bereikt ongeveer 80% een complete remissie na behandeling met chemotherapie.<sup>1</sup> Ondanks het bereiken van een morfologische complete remissie, ontwikkelen veel patiënten een recidief waarbij de vijfjaaroverleving slechts rond 40% is.<sup>1</sup> Een meer precieze definiëring van remissie is dan ook van belang voor het beter voorspellen van een recidief, zodat de behandeling daar tijdig op kan worden aangepast. Het bepalen van de aanwezigheid van meetbare restziekte ('measurable residual disease', voor-

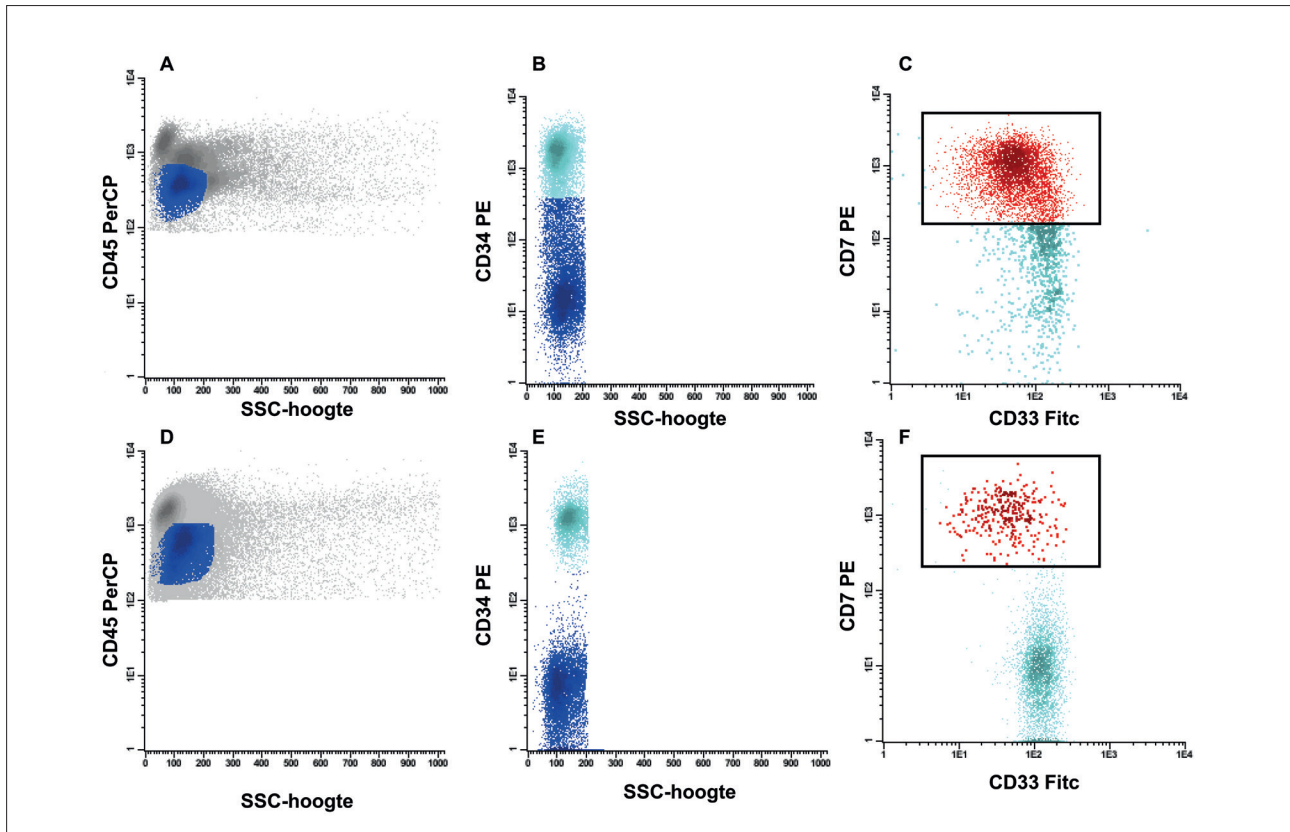
heen 'minimal residual disease'; MRD) is daartoe een belangrijke aanvulling op de morfologie. Het meten van de hoeveelheid MRD stelt ons in staat om op een heel nauwkeurige manier de diepte van de remissie te beoordelen. Het bepalen van MRD kan plaatsvinden met gebruik van verschillende 'targets', zoals de aanwezigheid van verschillende moleculaire afwijkingen of de aanwezigheid van bepaalde celoppervlakte-eiwitten. Bij laatstgenoemde, de flowcytometrische MRD-detectie, wordt gebruikgemaakt van eiwitexpressie aanwezig aan de binnen- of buitenzijde van het celoppervlak. Door bestudering van het eiwitexpressieprofiel is het mogelijk om cellen in verschillende differentiatiestadia van elkaar te onderscheiden. Doordat leukemiecellen vaak afwijkende oppervlakte-eiwitten tot expressie brengen is het, voor MRD-doeleinden, mogelijk om de normale hematopoëtische cellen te onderscheiden van de leukemiecellen (zie *Figuur 1*). Eerder verrichte studies waarin, door middel van flowcytometrie, de hoeveelheid MRD werd bepaald, hebben aangetoond dat

Correspondentie graag richten aan mw. dr. W. Zeijlemaker, afdeling Hematologie, Cancer Center Amsterdam, Amsterdam UMC, locatie VUmc, De Boelelaan 1117, 1081 HV Amsterdam, tel.: 020 444 26 04, e-mailadres: w.zeijlemaker@vumc.nl

Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: geen gemeld.

**Trefwoorden:** acute myeloïde leukemie, flowcytometrie, leukemiestamcellen, minimale/meetbare restziekte, prognose

**Keywords:** acute myeloid leukemia, flow cytometry, leukemic stem cells, minimal/measurable residual disease, prognosis



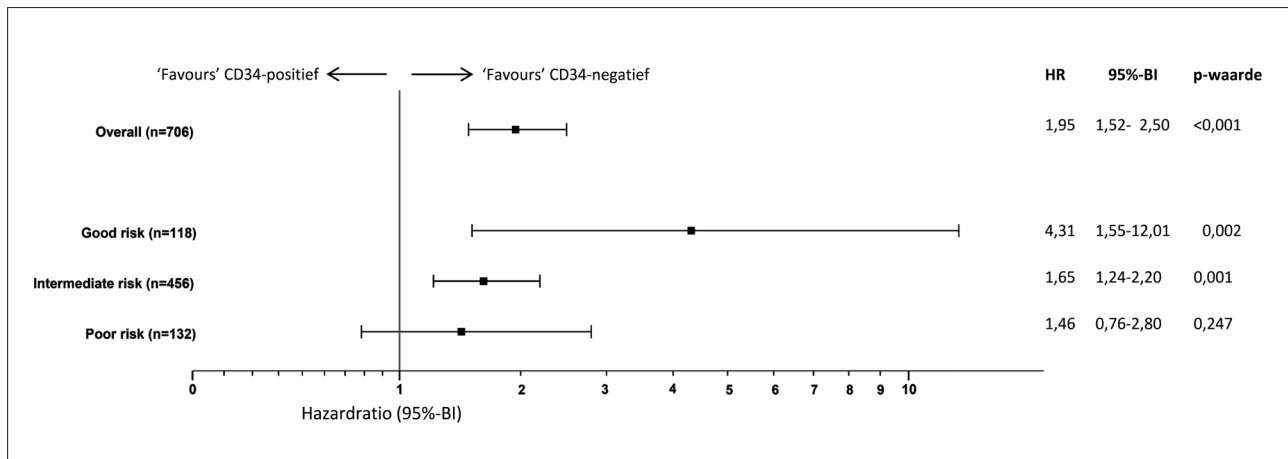
**FIGUUR 1.** Voorbeeld van MRD-detectie in het beenmerg van een AML-patiënt waarbij gebruik wordt gemaakt van afwijkende eiwitexpressie op het celoppervlak van AML-cellen. In dit voorbeeld is er ten tijde van de diagnose AML (**A-C**) en tijdens follow-up (**D-F**) afwijkende expressie van CD7 op de AML-cellen. Blasten (donkerblauw) worden gekarakteriseerd door intermediaire expressie van CD45 (in vergelijking tot expressie op de lymfocyten) en relatief lage zijwaartse lichtverstrooiing ('side scatter' [SSC]; **A, D**). In deze blasten wordt gekeken naar CD34-positieve progenitorcellen (lichtblauw; **B, E**) en naar afwijkende expressie van CD7 op deze myeloïde CD34-positieve progenitorcellen (cellen in rood; **C, F**). Na chemotherapie kan een kleine resterende celpopulatie worden gedetecteerd (MRD) gekenmerkt door de afwijkende CD7-expressie (**F**), die ook bij diagnose aanwezig was (**C**). *Figuur in aangepaste vorm eerder gepubliceerd in Intech Leukemia.*<sup>2</sup>

de hoeveelheid MRD een belangrijke prognostische factor is voor het voorspellen van een aankomend recidief en van overleving bij AML.<sup>3,4</sup> De studie beschreven in dit proefschrift is gericht op verdere verbetering van het flowcytometrisch bepalen van MRD met het uiteindelijke doel om per patiënt het risico op een recidief beter te kunnen voorspellen.

### AFWEZIGHEID VAN LEUKEMISCHE CD34-CELLEN BIJ AML

AML is een heterogene ziekte; elke leukemie is anders en zelfs bij één patiënt is veel variatie in leukemiecellen. In het eerste deel van het onderzoek is onderzocht of de aanwezigheid van bepaalde eiwitten en combinaties van eiwitten op het celoppervlak verschillend voorspellend zijn voor het risico op een recidief. Een belangrijk onderscheid kan hierbij worden gemaakt op basis van CD34-expressie. Eerder verrichte studies toonden tegenstrijdige resultaten betreffende

de prognostische waarde van CD34 ten tijde van diagnose, waarbij een grote meta-analyse concludeerde dat expressie van CD34 niet geassocieerd is met ziekte-uitkomst.<sup>5</sup> In ons onderzoek hebben we een nieuwe definitie van CD34-positiviteit en -negativiteit geïntroduceerd. Een CD34-positieve AML wordt hierbij gekarakteriseerd door de aanwezigheid van leukemische CD34-positieve cellen, ongeacht hun frequentie. Een CD34-negatieve AML is gedefinieerd als een AML zonder leukemische CD34-positieve cellen; wel kunnen bij zo'n CD34-negatieve AML (overigens net als bij CD34-positieve AML) nog kleine hoeveelheden normale CD34-positieve cellen aanwezig zijn.<sup>6</sup> Door gebruik te maken van celoppervlakte-eiwitten, zoals deze ook worden gebruikt voor het bepalen van MRD, konden we onderscheid maken tussen CD34-positieve en CD34-negatieve AML-patiënten. Om onze methode te valideren is gebruikgemaakt van aanwezige moleculaire afwijkingen in de leukemiecellen (FLT3<sup>itd</sup>,



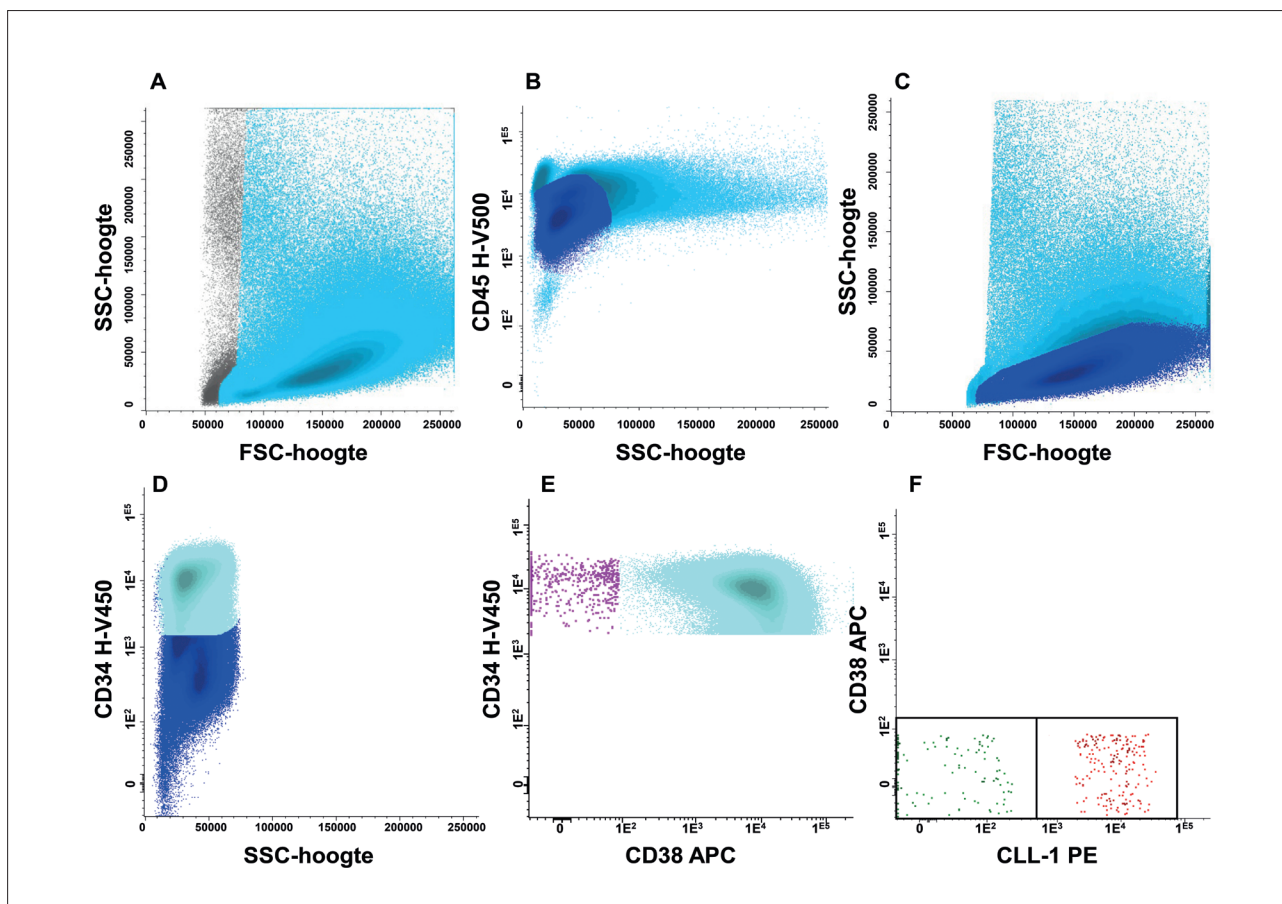
**FIGUUR 2.** Forestplot van hazardratio's voor 'event'-vrije overleving (EFS) in verschillende risicogroepen. In de forestplot zijn de hazardratio's weergegeven voor 118 'good risk', 456 'intermediate risk' en 132 'poor risk' AML-patiënten. De horizontale lijnen representeren de 95%-betrouwbaarheidsintervallen (95%-BI). *Figuur oorspronkelijk gepubliceerd in The British Journal of Haematology.*<sup>6</sup>

NPM1). Bij de analyses werd ook rekening gehouden met overige kenmerken van een AML, zoals de bekende relatie tussen aanwezigheid van een *NPM1*-mutatie en lage CD34-expressie. In een multivariate analyse, waarin naast bekende AML-risicofactoren de *FLT3/NPM1*-status werd geïncorporeerd, ging CD34-positiviteit gepaard met een risico (hazardratio [HR]) van 1,57 (95%-betrouwbaarheidsinterval [BI] 1,08-2,29) op overlijden en 1,81 (95%-BI 1,15-2,85) op het ontstaan van een recidief. Door het maken van dit onderscheid op basis van CD34-expressie en overige karakteristieken hebben we bij een grote groep AML-patiënten (n=706) kunnen aantonen dat CD34-negatieve AML-patiënten een significant betere ziekte-uitkomst hebben in vergelijking met CD34-positieve AML-patiënten. In subgroepanalyses werd eveneens een significant verschil in prognose gevonden op basis van CD34-expressie in zowel de goed- als intermediair-risicogroep. CD34-expressie kan dus van additionele waarde zijn naast het gebruik van de huidige AML-risicogroepen (zie *Figuur 2*).

### CD34+CD38-LEUKEMIESTAMCELLEN

In eerder onderzoek is aangetoond dat binnen de populatie van MRD-cellen een kleine subgroep onrijpe leukemiecellen bestaat die te onderscheiden is van de overige leukemische blasten. De cellen in deze kleine subgroep worden ook wel leukemiestamcellen (LSC) genoemd. In ons onderzoek hebben we ons geconcentreerd op leukemiestamcellen met het CD34+CD38-immunofenotype. Deze LSC hebben de eigenschap zich ongelimiteerd te kunnen vernieuwen ('self-renewal') resulterend in nieuwe LSC en te kunnen differentiëren tot progenitoren die met hun grote delings-

capaciteit de klinische problemen bij AML veroorzaken. Daarnaast wordt gedacht dat deze LSC vaak therapie-ongevoelig zijn. Er wordt dan ook verondersteld dat deze LSC aan de basis staan van het ontwikkelen van AML, maar ook van de uitgroei van therapieresistente cellen na therapie, leidend tot een recidief. Door middel van flowcytometrie kunnen deze LSC's worden herkend aan expressie van CD34 en het ontbreken van CD38 op het celoppervlak. Normale hematopoëtische stamcellen (HSC) hebben hetzelfde CD34+CD38-profiel en dus wordt gebruikgemaakt van afwijkende celoppervlakte-eiwitten om verschil te maken tussen CD34+CD38-HSC en CD34+CD38-LSC (zie *Figuur 3*, pagina 419). In *Figuur 3* wordt stapsgewijs het proces van detectie van CD34+CD38-LSC in AML-beenmerg weergegeven. Deze flowcytometrische techniek is gevalideerd in muismodellen.<sup>7</sup> In een eerste retrospectieve studie hebben we kunnen aantonen dat de aanwezigheid van veel CD34+CD38-LSC na chemotherapie geassocieerd is met een hoger risico op een recidief en overlijden in vergelijking met patiënten met weinig of geen aantoonbare CD34+CD38-LSC.<sup>7</sup> Deze resultaten hebben we kunnen valideren in een grote prospectieve studie waarin bij 594 patiënten (<65 jaar) bij diagnose en 302 patiënten na een tweede chemokuur de frequentie CD34+CD38-LSC is bepaald. De cumulatieve incidentie van een recidief (CIR) na drie jaar was 36% voor LSC-negatieve patiënten (n=204) versus 61% voor LSC-positieve patiënten (n=98). In deze studie kon worden bevestigd dat het meten van de hoeveelheid LSC na een tweede kuur een belangrijke aanvullende prognostische factor is naast de reeds bekende AML-risicofactoren. Om te achterhalen of het bepalen van de hoeveelheid CD34+CD38-LSC na chemo-



**FIGUUR 3.** Voorbeeld van CD34+CD38-LSC-detectie in het beenmerg van een AML-patiënt. **A-C** toont de identificatie van blasten (donkerblauw gekleurd) binnen de populatie van witte bloedcellen (blauw). Binnen de populatie van blasten worden de CD34-positieve blasten geïdentificeerd (lichtblauw; **D**). **E** toont de markering van CD34-positieve en CD38-negatieve blasten (paars). Figuur **F** toont de CLL-1-expressie van de CD34+CD38-cellen. CLL-1 is één van de markers die frequent tot expressie komt op LSC en afwezig is op CD34+CD38-HSC. Twee populaties worden onderscheiden: een CLL-1-negatieve populatie (groen), welke de CD34+CD38-HSC bevat, en een CD34+CD38-populatie met sterke expressie van CLL-1 (rood). Deze CD34+CD38-cellen met aberrante CLL-1-expressie worden gedefinieerd als CD34+CD38-LSC (**F**).

*Figuur in aangepaste vorm eerder gepubliceerd in Intech Leukemia.<sup>2</sup>*

therapie iets toevoegt aan de veelal gebruikte MRD-bepaling, zijn de MRD- en LSC-gegevens in deze studie gecombineerd. MRD- en LSC-waarden na de tweede kuur waren beschikbaar bij totaal 242 AML-patiënten. Hierbij is aangetoond dat patiënten met  $\geq 0,1\%$  MRD (MRD<sup>positief</sup>) en  $> 0,00\%$  LSC (LSC<sup>positief</sup>) na de tweede kuur een significant grotere kans hebben op een recidief in vergelijking met patiënten met weinig MRD (MRD $< 0,1\%$ , MRD<sup>negatief</sup>) en/of weinig LSC (LSC  $\leq 0,00\%$ , LSC<sup>negatief</sup>). Een aanvullende multivariate analyse, waarin rekening werd gehouden met overige AML-risicofactoren, toonde dat de hoeveelheid LSC, gemeten na een tweede kuur, belangrijke meerwaarde heeft voor het voorspellen van de kans op een recidief en overlijden bij AML-patiënten (MRD<sup>pos</sup>LSC<sup>pos</sup>; HR 5,89 voor het optreden van een recidief en HR 3,62 voor overlijden).

### EEN SIMPELE TOEPASSING VOOR BEPALING VAN DE HOEVEELHEID LEUKEMIESTAMCELLEN

Het bepalen van de hoeveelheid MRD door middel van flowcytometrie of moleculaire methoden is reeds geïncorporeerd in de dagelijkse klinische praktijk. In de AML HOVON 132-studie ( $\leq 65$  jaar) was MRD, zoals bepaald na de tweede kuur door middel van flowcytometrie of moleculair onderzoek, reeds van belang voor het bepalen van de consolidatietherapie. Intermediair-risicopatiënten die MRD-positief waren, ondergingen bij voorkeur een allogene stamceltransplantatie, terwijl MRD-negatieve patiënten binnen deze zelfde risicogroep bij voorkeur een autologe stamceltransplantatie ondergingen. Bepaling van de hoeveelheid CD34+CD38-LSC vindt alleen nog plaats in onderzoeksverband. De bepaling van LSC is

## AANWIJZINGEN VOOR DE PRAKTIJK

- 1** CD34-positiviteit van de leukemiecellen ten tijde van de diagnose AML geeft een significant hoger recidief- en sterfterisico ten opzichte van CD34-negativiteit bij diagnose.
- 2** AML-patiënten met weinig/geen aantoonbare CD34+CD38-LSC na een tweede chemokuur hebben een significant betere overleving en minder recidieven in vergelijking met AML-patiënten met veel CD34+CD38-LSC na een tweede kuur.
- 3** De combinatie van het meten van de hoeveelheid MRD en CD34+CD38-LSC na een tweede kuur is een belangrijke risicofactor bij AML naast reeds bekende AML-risicofactoren. MRD is reeds geïncorporeerd in huidige risicogroepindelingen en overwogen kan worden om de LSC-bepaling eveneens te incorporeren in toekomstige AML-risicogroepindelingen.
- 4** Een nieuw ontwikkelde CD34+CD38-LSC-detectiemethode is beschikbaar welke minder tijdrovend is ten opzichte van huidige LSC-metmethoden. Deze methode is bruikbaar voor het bepalen van de hoeveelheid LSC in toekomstige klinische AML-studies.

bewerkelijk en tijdrovend doordat LSC vaak in kleine hoeveelheden aanwezig zijn (bijv. 1:1.000.000), waardoor analyse van miljoenen cellen nodig is voor een nauwkeurige bepaling. Tevens zijn LSC, net als MRD-cellen, zeer heterogeen qua eiwitexpressie. Dit laatste heeft tot gevolg dat voor elke patiënt veel verschillende oppervlakte-eiwitten moeten worden bestudeerd teneinde een patiënt-specifiek expressiepatroon te kunnen vaststellen. Voor de toekomstige klinische toepassing van de LSC-bepaling is het daarmee van groot belang dat een makkelijk toepasbare test beschikbaar komt. Hiertoe hebben we 15 verschillende oppervlakte-eiwitten, die vaak tot expressie komen op CD34+CD38-LSC, vergeleken bij een grote groep AML-patiënten. Uiteindelijk kon een uitspraak worden gedaan welke oppervlakte-eiwitten noodzakelijk zijn voor betrouwbare LSC-detectie. Door een nieuwe combinatie van antistoffen te definiëren die benodigd zijn om bij alle patiënten betrouwbaar LSC te meten, bleek het mogelijk één specifieke laboratoriumbuis te gebruiken ongeacht de patiënt.<sup>8</sup> Deze opzet vereist minder beenmergmateriaal en is minder tijdrovend ten opzichte van de huidige methode. Deze nieuwe detectiemethode is geschikt voor gebruik in toekomstige klinische studies waarin de hoeveelheid CD34+CD38-LSC moet worden gemeten voor prognostische doeleinden in de dagelijkse praktijk.

## CONCLUSIE

In de studies beschreven in dit proefschrift geven we verschillende handvatten voor het verbeteren van de risico-inschatting op een recidief en/of overlijden bij AML. Het gebruik van de combinatie van de hoeveelheid MRD en CD34+CD38-LSC na een tweede chemokuur, zoals bepaald door

middel van flowcytometrie, is een veelbelovende parameter om, samen met toepassing van bestaande risicofactoren, tot een betere prognose voor AML-patiënten te komen. Op basis van de resultaten beschreven in dit proefschrift kan worden overwogen om, naast MRD, ook de CD34+CD38-LSC-bepaling te incorporeren in toekomstige AML-risicogroepindelingen.

## REFERENTIES

1. Löwenberg B, et al. Cytarabine dose for acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2011;364(11):1027-36.
2. Zeijlemaker W, et al. Minimal residual disease and leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2012;1-32. DOI: 10.5772.52080.
3. Terwijn M, et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study. *J Clin Oncol* 2013;31(31):3889-97.
4. Freeman SD, et al. Prognostic relevance of treatment response measured by flow cytometric residual disease detection in older patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2013;31(32):4123-31.
5. Kanda Y, et al. The clinical significance of CD34 expression in response to therapy of patients with acute myeloid leukemia: an overview of 2483 patients from 22 studies. *Cancer* 2000;88(11):2529-33.
6. Zeijlemaker W, et al. Absence of leukaemic CD34+ cells in acute myeloid leukaemia is of high prognostic value: a longstanding controversy deciphered. *Br J Haematol* 2015;171:227-38.
7. Terwijn M, et al. Leukemic stem cell frequency: a strong biomarker for clinical outcome in acute myeloid leukemia. *PLoS One* 2014;9(9):e107587.
8. Zeijlemaker W, et al. A simple one-tube assay for immunophenotypical quantification of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2016;30:439-46.

ONTVANGEN 22 MEI 2018, GEACCEPTEERD 9 JULI 2018.