

A kolorektális karcinómák immunterápiára való alkalmasságának patológiai vizsgálata

BOGNER BARNA

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, Patológiai Intézet, Pécs

Levelezési cím:

Dr. Bogner Barna, PTE ÁOK, Patológiai Intézet,
7643 Pécs, Pf.: 99, tel.: 72/536-282,
e-mail: bogner.barna@gmail.com

Közlésre érkezett:

2019. augusztus 8.

Elfogadva:

2019. augusztus 26.

A kolorektális karcinómák rendkívül heterogén megjelenésű daganatok. Ez a heterogenitás már a műtéti preparátumok indítása során is megmutatkozik. Míg a medulláris karcinómák expanszív növekedési mintázatuk következtében a környező nem tumoros állománytól élesen elhatárolódnak, strómaszegénységük miatt inkább velős megjelenésűek, a mikroszatellita-instabilitásból adódó tumor-neoantigének tömege miatt környezetükben számos megnagyobbodott, reaktív nyirokcsomó található, addig a low-grade, strómaszegénységük miatt tömött, infiltratív növekedési mintázatú, mikroszatellitastabil típusú tumorok spikuláltak és változó méretű, sokszor kicsi, de szintén tömött nyirokcsomóáttétet tartalmazhatnak. E makroszkóposan és hisztológiailag is tetten érhető heterogenitás a tumor immunológiai, immunhisztokémiai és molekuláris jellegzetességeiben is megmutatkozik, s ezek a betegség prognózisát és kezelhetőségét is meghatározzák. Mivel az immunterápia újabb frontot nyitott a kolorektális karcinómák ellátásában, a patológiai leletnek jól kvantifikálható módon tükröznie kell a daganatos mikrokörnyezet – így a peritumorális limfoid infiltrátum, tumorinfiltráló limfociták és daganatstróma – jellegzetességeit annak érdekében, hogy megfelelő betegkiválasztással jó terápiás választ érhesünk el. *Magy Onkol 63:192-195, 2019*

Kulcsszavak: vastagbélrák, Immunoscore, mikroszatellita-instabilitás, PD-1/PD-L1

Colorectal carcinomas are heterogeneous in their morphologic, immunologic and molecular aspects. The smooth and sharply demarcated medullary carcinomas present with an expansive border and high tumor stroma ratio. The high load of cancer neoantigens as a consequence of microsatellite instability results in numerous reactive regional lymph nodes. In contrast, the low grade, MSS type carcinomas are spiculated, desmoplastic and hard, frequently with smaller and sometimes also desmoplastic lymph node metastases. This macroscopic and histological heterogeneity is mirrored on the immunohistochemical and molecular level and is decisive from prognostic and predictive point of view. As immunotherapy opened a new front in the therapy of colorectal cancer, the pathology report has to quantify and qualify the characteristics of the tumor microenvironment, the peritumoral and intratumoral lymphoid infiltration and tumor stroma ratio in order to improve patient selection.

*Bogner B. Predictive markers of immunotherapy of colorectal cancer. *Magy Onkol 63:192-195, 2019**

Keywords: Immunoscore, mismatch repair, PD-1/PD-L1, colorectal cancer

BEVEZETÉS

A kolorektális karcinóma a 3. leggyakoribb daganatos megbetegedés a fejlett országokban és az egyik vezető daganatos halálok világszerte. A műtéti eltávolítást követő 5 éves túlélése: I. stádiumban 91,1%, II. és III. stádiumban 71,7% és IV. stádiumban 13,3%. A stádiumok szerinti mortalitása: I/II.: 8–13%, III.: 11–47%, IV.: 89%. Míg I. stádiumban a sebészi eltávolítás elegendő, a magas rizikójú II. és III. stádiumú betegek a sebészi reszekciót követően standard 5-fluorouracil-alapú adjuváns kemoterápiában részesülnek. A IV. stádiumú betegeknél a primer tumor és/vagy a metasztázis sebészi eltávolítását vagy sugárterápiás/intervenciós radiológiai kezelését követően különféle kemoterápiás protokollok mellett célzott terápiák lehetségesek. Az áttétes betegek túlélési mutatói immunterápia segítségével is javíthatók, de fontos tudni, hogy kik profitálhatnak e kezelési modalitásból.

PATOLÓGIA (1)

A kolorektális karcinómák klinikai jellemzői – életkor, nem, lokalizáció – és morfológiai sajátosságai – szövettani típus, növekedési mintázat, a tumor strómájának és limfoid infiltrátumának jellegzetességei – alapján fontos következtetések vonhatók le a daganat molekuláris szubtypusára és precíziós immunterápiára való alkalmasságára is.

A szövettani típusok közt különös figyelmet érdemelnek a szokványos adenokarcinómától (NOS) elkülönülő mucinózus, medulláris, mikropapilláris, szerratált szubtypusok és a differenciálatlan daganatok (2). A kolorektális karcinómák feldolgozása során már makroszkóposan elkülönülnek az expanzív növekedési széllel bíró, strómaszegény, gyakran exofitikus és az infiltratív, dezmozplasztikus strómájú, inkább endofitikus daganatok. Előbbiek esetében jellemzőbb a peritumorális limfoid infiltráció, melyhez medulláris és mucinózus/pecsétgyűrűsejtes tumorok esetében számos tumorinfiltráló limfocita társul (3).

A tumor differenciációját (grádusát) a szokványos adenokarcinómák esetében a mirigyképző hajlam szabja meg – 50% felett low-grade, ez alatt high-grade tumorokról beszélünk (4). A speciális szubtypusok esetében a mikroszatellita-instabilitás / mismatch repair státusz alapján adjuk meg a tumor „molekuláris” grádusát. A high-grade tumoroknál és a speciális szubtypusok esetében rutinsze-

rűn MLH1 és MSH2 immunhisztokémiai vizsgálat történik. A mismatch repair fehérjék egyikének magi kiesése high-grade tumort jelent.

MIKROSZATELLITA-INSTABILITÁS

A mismatch repair (MMR) fehérjék elleni antitestek használata segítségével az érintett gének mutációi által okozott Lynch-szindróma, illetve a sporadikusan fellépő mikroszatellita-instabilitás (MSI) is vizsgálható. A mismatch repair fehérjék heterodimereket képeznek; minden heterodimer két fehérjéből áll, melyek fix párokban fordulnak elő: MLH1-PMS2, MSH2-MSH6. A heterodimer-komplex jelenléte határozza meg az immunhisztokémiai eredményt (+ vagy –), és a legtöbb esetben egyben belső kontrollként is szolgál (5). Az MLH1 kiesése a legtöbb esetben együtt jár a PMS2, illetve az MSH2 az MSH6 kiesésével. Lynch-szindróma esetén azonban az MSH6, illetve PMS2 fehérje önálló kiesése is előfordulhat (1. táblázat).

AZ IMMUNOSCORE (IS)

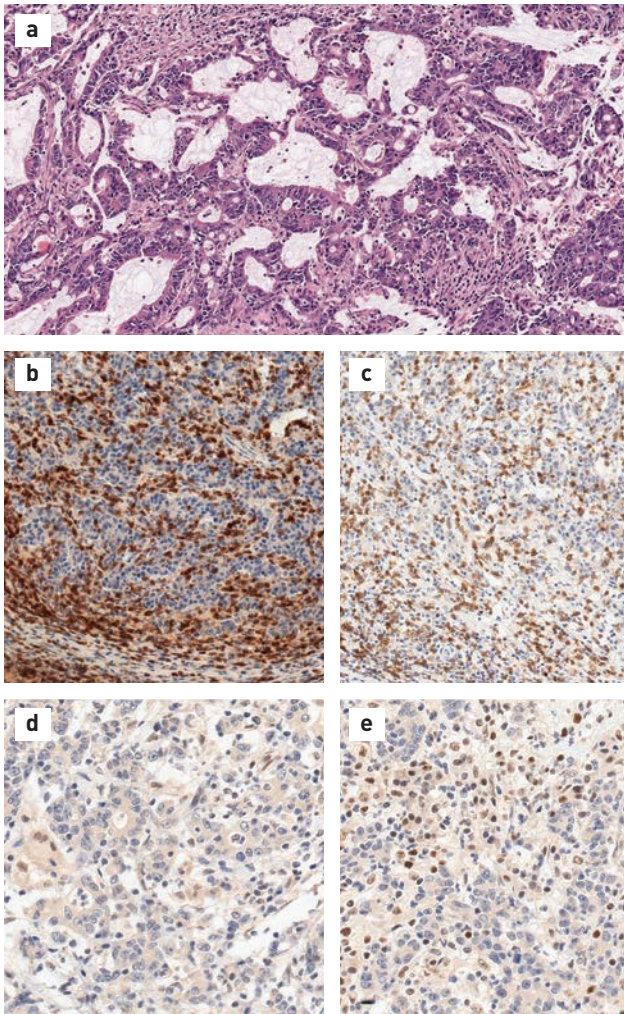
Az ún. Immunoscore meghatározása a tumor centrumának (TIL) és növekedési frontjának CD3+ és CD8+ T-sejtjeit értékeli. Ezek alapján a vastagbélrákokat magas, közepes vagy alacsony IS-sel jellemzett formákra lehet osztani. Amennyiben a kétféle T-sejt mindkét régióban hiányzik, immunológiai inaktív, ha nagy számban van jelen, immunológiai aktív formáról van szó, és nyilván a kettő között átmeneti formák vannak. Az értékelés prognosztikus erejét mutatja, hogy magas Immunoscore esetén (IS4), amikor a limfoid denzitás 70–100%, az 5 éves kiújulási arány 8%, közepes Immunoscore-nál (IS2–3), amikor a limfoid denzitás 25%–70%, ez az arány 19%, míg alacsony Immunoscore-nál (IS0–1), amikor a limfoid denzitás 0–25%, a recidívaarány megemelkedett (32%) (6, 7). Az IS meghatározását képanalízissel vagy szemikvantitatív módon is lehet végezni, az eredmények hasonlóak (8). Bár a fenti protokoll kidolgozásához eredetileg nem használtak rektumrákokat, újabb adatok szerint a végbélrákok neoadjuváns kemoradioterápiás kezelését követően is alkalmazható az Immunoscore (9).

Az immunsejtek elhelyezkedése, denzitása és funkcionális orientációja alapján meghatározható a daganat mikrokönyezete, mely alapján a daganatok négy csoportba sorolhatók (10). Immunológiai aktív daganatokban magas az IS, mert

1. TÁBLÁZAT. MSI-MMR immunhisztokémiai festődés kolorektális karcinómákban

MSI betegségstátusz	MMR-mutációk	MLH1-IHC	PMS2-IHC	MSH2-IHC	MSH6-IHC
Sporadikus vagy Lynch-szindróma	MLH1-mutáció	kiesett	kiesett	megtartott	megtartott
Lynch-szindróma	MSH2-mutáció	megtartott	megtartott	kiesett	kiesett
Lynch-szindróma	MSH6-mutáció	megtartott	megtartott	megtartott	kiesett
Lynch-szindróma	PMS2-mutáció	megtartott	kiesett	megtartott	megtartott

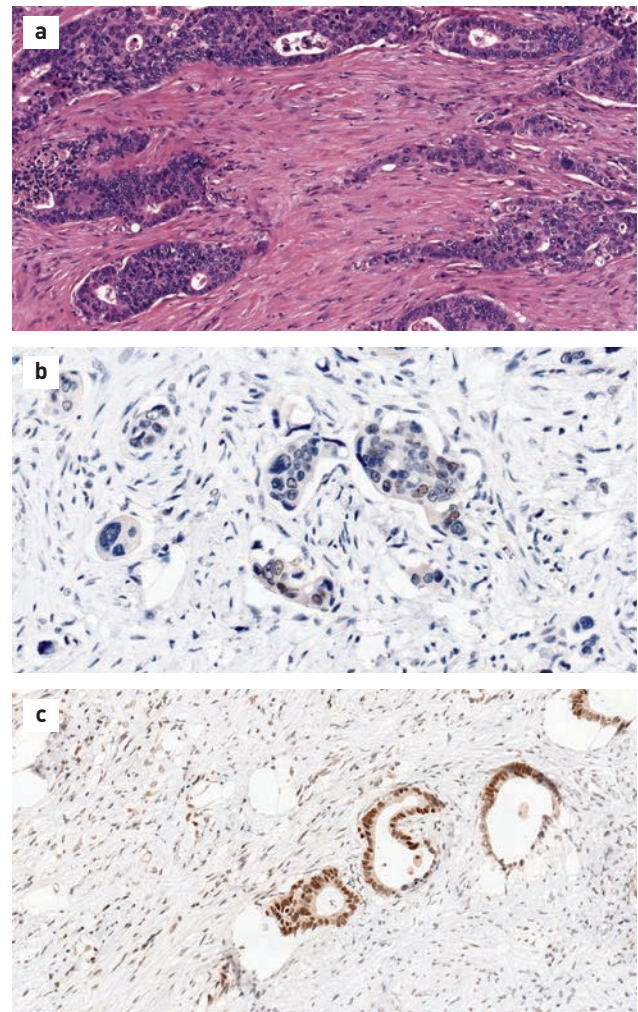
IHC: immunhisztokémia



1. ÁBRA. MSI-pozitív medulláris karcinóma. a) A HE-festett metszeten az expanzív növekedési szél, magas tumor/stróma arány (kifejezett strómaszegénység) mellett, a kifejezett peritumorális limfoid infiltrátum és a nagyszámú tumorinfiltráló limfocita is jól látható. b) CD3⁺ T-sejtek magas denzitása intra- és peritumorálisan. c) CD8⁺ T-sejtek magas denzitása intra- és peritumorálisan. d) MLH1 magi reakció hiánya a daganatsejtekben. e) PMS2 magi reakció hiánya a daganatsejtekben

a T-sejt-infiltráció erős, sok a citotoxikus T-sejt (1. ábra). Ugyanakkor e tumorokban gyakran expresszálódnak a gátló immunellenőrző pont receptorok (PD-1, CTLA-4, TIM3 vagy LAG3). A közepes IS-sel jellemzett csökkent immunitású daganatokban CD3⁺ és CD8⁺ T-sejtek is vannak, azonban mellettük megjelennek a regulátor T-sejtek és a mieloid szuppresszor sejtek is a strómában immunszuppresszív citokinekkal (TGF- β és VEGF). A daganatból kizárt T-sejtes infiltrációjú daganatok Immunoscore-ja szintén közepes; esetükben a daganatfészkekből hiányoznak a T-sejtek, azok a stromális határon gyűlnek fel, a daganat erei és strómája aberráns és általában hipoxia áll fenn. Az immunológiailag inaktív daganatokban (2. ábra) az IS alacsony, a T-sejtek nem csak a daganatsejtfészkekből,

hanem a strómából is hiányoznak. Megjegyzendő, hogy a mikrokörnyezet tekintetében a vastagbélrák eltérő szöveti típusai nagy változatosságot mutatnak, de még ugyanazon beteg tumorának eltérő területeiből vett mintákban is nagy eltérések adódhatnak. Ez a heterogenitás sok egymástól eltérő tényező következménye, s függhet a daganat mutációs terhelésétől, az onkogének érintettségétől, a tumor mikrokörnyezetében jelen lévő pozitív és negatív szabályozóktól. A tumor mikrokörnyezete a daganat progressziója vagy recidívája során azonban tovább változhat. A kialakuló áttétek genomikailag és immunológiailag is eltérhetnek a primer tumortól. A „folyékony biopszia” a tumor mikrokörnyezetének vizsgálatára alkalmatlan, így a biopsziából történő meghatározásnak ebből a szempontból nincsen alternatívája.



2. ÁBRA. MSI-negatív kolon-adenokarcinóma. a) Low-grade, infiltratív növekedési mintázatú, alacsony tumor/stróma arányú (kifejezetten strómából), peritumorális limfoid infiltrátumot és tumorinfiltrátumot nem tartalmazó, „hideg” tumor (HE-festés). b) MLH1-pozitív magi reakció a daganatsejtekben. c) MSH2-pozitív magi reakció a daganatsejtekben

KONSZENZUS MOLEKULÁRIS ALCSOPORTOK (11)

Az immunsejtes, fibroblasztos, angiogén mikrokörnyezet analizálásával nyert négyféle mintázat a molekuláris alcsoportokkal szoros korrelációt mutat. A jó prognózisú mikrosatellita-instabil konszenzus molekuláris szubtypus (CMS1) és a rossz prognózisú CpG-sziget-metilátor fenotípusú (CIMP) mezenhimális alcsoport (CMS4) a limfocitákra és mieloid sejtekre specifikus géneket egyaránt expresszálja, de míg az MSI alcsoportban kifejezett a citotoxikus CD8⁺ és natural killer (NK-) sejtes infiltráció (1. ábra), addig a mezenhimális alcsoportban a tumorasszociált fibroblasztok és endotélsejtek dominálnak (2. ábra). Ezzel szemben a CMS2 alcsoport magas kromoszomális instabilitással, a Wnt- és Myc-útvonalak aktiválódásával, a CMS3 ún. metabolikus alcsoport pedig KRAS-mutációval jellemezhető. Az MSI-típusú alcsoportban a T-sejt-attractáns kemokinek (CXCL9, CXCL10 és CXCL16), a jobb prognózissal összefüggésbe hozható tercier limfoid struktúrák képződéséért felelős kemokint (CXCL13) és a Th1 citokinek (IFN- γ és IL-15) kódoló gének fokozott expressziója látható. Ezzel szemben a mezenhimális CMS4 alcsoportban a mieloid kemokin (CCL2), komplementkomponensek, angiogén faktorok és immunosuppresszív molekulák vannak jelen. Fontos jellemző, hogy a PD-1-ligandumot kódoló gének (CD274 és PDCD1LG2) magasan expresszálódnak az MSI-típusú alcsoportban, de egyes mezenhimális alcsoportba tartozó tumorokban is. Az MSI-típusú alcsoport sejtes összetétele és ennek funkcionális orientációja következtében magas Immunoscore-értékkel jellemezhető. Fontos kiemelni, hogy a hipermutált, immunterápiára kiválóan alkalmas CMS1 „immun” alcsoport nem korlátozódik az MMR-génhibás daganatokra, hanem az exonukleázdomén POLE-mutált tumorokat is magába foglalja.

PD-1/PD-L1 VASTAGBÉLRÁKBAN

A CD274 (PD-L1)/PDCD1 (PD-1) útvonal döntő jelentőségű az immunválasz és a tolerancia szempontjából. Az aberráns CD274-expresszió révén a daganatsejtek elkerülhetik a gazda-

szervezet immunválaszát és adaptív immunrezisztenciát fejleszhetnek ki. 454 kolorektális karcinómát vizsgálva 12%-ban észleltek CD274-expressziót. Ezek 83%-ban a jobb kolonfélnben vagy a harántvastagbélben, jellemzően idősebb betegekben fordultak elő, rosszul differenciált (szolid vagy medulláris) fenotípusúak voltak, gyakran mismatch repair károsodás és BRAF-mutáció volt kimutatható közöttük (12, 13). Ugyanakkor megjegyzendő, hogy a kolorektális karcinómák immunellenőrzőpont-gátlókkal végzett klinikai vizsgálatai mind sikertelenek voltak, mert nem szelektált beteganyagot végeztek ezeket, és a PD-L1+ alcsoportokban sem voltak hatékonyak, csakis és kizárólag az MSI-pozitív esetekben.

HAZAI KONZEKVENCIÁK

A Royal College of Pathologists kolorektális módszertani levele a kolorektális karcinómák nem „core” hisztológiai jellemzői között felsorolja a növekedési szél mintázatát (infiltratív vagy expanszív), a tumorbimbózás (budding) meglétét, a peritumorális gyulladást és a tumor/stróma arányt, tehát a daganatok immunológiai hátterének vizsgálatát indokoltnak tartja (1). Bár a peritumorális limfoid infiltrátum és a tumorinfiltráló limfociták meglétének hematoxin-eozin festéssel történő vizsgálata a rutin leletezés része, de a vizsgálok közötti jelentős eltérés miatt eddig ennek a klinikai gyakorlatban való hasznosulása kevésbé tükröződött. A számítógépes képi analízissel történő Immunoscore-meghatározás ebben segíthet, de ehhez előbb ennek el kell terjednie. Mindazonáltal a nemzetközi irányelvek megkövetelik a kolorektális karcinómák patológiai leletezéséhez az Immunoscore és az MSI-státusz meghatározását. Mivel az MMR-vizsgálat 4 antitesttel, az Immunoscore CD3 és CD8 elleni antitestekkel történő meghatározása, továbbá a PD-1/PD-L1 vizsgálata meghaladja a jelenlegi finanszírozási keretet (esetenként maximum 5 immunhisztokémiai vizsgálat), ezek rutinszerű alkalmazása előtt meg kell teremteni a megfelelő finanszírozási hátteret.

IRODALOM

1. The Royal College of Pathologists. Standards and datasets for reporting cancers. Dataset for histopathological reporting of colorectal cancer; September 2018. <https://www.rcpath.org/uploads/assets/c8b61ba0-ae3f-43f1-85ffd3ab9f17cfe6/g049-dataset-for-histopathological-reporting-of-colorectal-cancer.pdf>
2. Remo A, Fassan M, Vanoli A, et al. Morphology and molecular features of rare colorectal carcinoma histotypes. *Cancers* 11:pii: E1036, 2019
3. Kong JC, Guerra GR, Pham T, et al. Prognostic impact of tumor-infiltrating lymphocytes in primary and metastatic colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 62:498–508, 2019
4. Ueno H, Kajiwara Y, Shimazaki H, et al. New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 36:193–201, 2012
5. Chen W, Swanson BJ, Frankel WD. Molecular genetics of microsatellite-unstable colorectal cancer for pathologists. *Diagn Pathol* 12:e24, 2017
6. Galon J, Pagès F, Marincola FM, et al. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med* 10:205, 2012
7. Pagès F, Marliot F, Bindea G, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet* 391:2128–2139, 2018
8. Forrest R, Guthrie GJ, Orange C, et al. Comparison of visual and automated assessment of tumour inflammatory infiltrates in patients with colorectal cancer. *Eur J Cancer* 50:44–52, 2014
9. Anitei MG, Zeitoun G, Mlecnik B, et al. Prognostic and predictive values of the immunoscore in patients with rectal cancer. *Clin Cancer Res* 20:1891–1899, 2014
10. Galon J, Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov* 18:197–218, 2019
11. Guinney J, Dienstman R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 21:1350–1356, 2015
12. Marginean EC, Melosky B. Is there a role for programmed death ligand-1 testing and immunotherapy in colorectal cancer with microsatellite instability? Part I-colorectal cancer: microsatellite instability, testing, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med* 142:17–25, 2018
13. Inaguma S, Lasota J, Wang Z, et al. Clinicopathologic profile, immunophenotype, and genotype of CD274 (PD-L1)-positive colorectal carcinomas. *Mod Pathol* 30:278–285, 2017