

Význam imunitního infiltrátu v nádorovém mikroprostředí karcinomů hlavy a krku

Vladimír Koucký¹, Jan Bouček¹, Jan Plzák¹, Anna Fialová²

¹Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole, Praha

²Sotio a. s., Praha

Karcinomy hlavy a krku tvoří prognosticky nepříznivou skupinu onemocnění zatíženou jak vysokou mortalitou, tak i morbiditou způsobenou klasickými léčebnými postupy, jako je chirurgie, radioterapie a chemoterapie. Tyto nádory však patří mezi onemocnění s početným zastoupením imunitních buněk, které je ještě umocněno u tumorů indukovaných HPV, a jsou tak velmi perspektivním cílem imunoterapeutických postupů. Imunoterapie za využití blokátorů kontrolních bodů imunitního systému se v posledních letech stala jedním z pilířů onkologické terapie, kterou lze aplikovat již v 1. linii léčby u rekurentního a metastatického karcinomu hlavy a krku. Na tuto léčbu ale překvapivě reaguje pouze malá část pacientů. Podrobná analýza imunitního infiltrátu v nádorovém mikroprostředí je pak jedním z klíčů ke zlepšení léčebných výsledků a k efektivnější stratifikaci pacientů, kteří mohou z aplikace imunoterapie a zmírnění klasické terapie profitovat.

Klíčová slova: karcinomy hlavy a krku, HPV, imunoterapie, nádorové mikroprostředí, tumor-infiltrující leukocyty.

Importance of immune cell infiltration in tumor microenvironment of head and neck cancer

Head and neck cancer is prognostically unfavourable group of diseases burdened by high mortality and morbidity following classic treatment regimens, such as surgery, radiotherapy and chemotherapy. Nevertheless, these tumors are highly infiltrated by immune cells, especially in case of HPV induced tumors, and constitute a perspective target for immune-based treatment. Immunotherapy with checkpoint inhibitors has become one of the basic pillars of cancer therapy, that is applicable as a first line treatment in recurrent and metastatic head and neck cancer. However, only a small fraction of patients is responsive to the therapy. In-depth analysis of immune cells in the tumor microenvironment could be the key element for improvement of current treatment regimens and effective stratification of patients that could benefit from immunotherapy and de-intensification of classic therapeutic protocols.

Key words: head and neck cancer, HPV, immunotherapy, tumor microenvironment, tumor-infiltrating leukocytes.

Úvod

Zhoubné nádory hlavy a krku tvoří heterogenní skupinu onemocnění. Nejvýznamnějším histo-patologickým subtypem je dlaždicobuněčný karcinom (head and neck squamous cell carcinoma; HNSCC), který reprezentuje přibližně 90 % malignit hlavy a krku. Ani tento subtyp však netvoří uniformní onemocnění a jednotlivé nádory se značně klinicky i biologicky liší v závislosti na lokalitě, ve které vznikají. Mezi nejvýznamnější faktory, které

k tomuto jevu přispívají, patří rozdílná etiologie, anatomické bariéry ovlivňující lokální šíření a lymfatická drenáž.

V roce 2018 bylo celosvětově diagnostikováno přibližně 890 000 nových případů HNSCC a incidence má nadále vzestupný trend (1). Z hlediska etiologie je velká část HNSCC, především v oblasti dutiny ústní, hrtanu, hypofaryngu a dutiny nosní, asociována s užíváním tabákových výrobků a konzumací alkoholu, které navzájem potencují svůj

karcinogenní účinek (2). Dalším významným činitelem je infekce vysoce rizikovými kmeny lidského papillomaviru (HPV), především HPV 16. HPV je v současnosti považován již za klasického induktora karcinomů v oblasti orofaryngu (OPSCC). V závislosti na geografickém regionu je zodpovědný až za 90 % těchto nádorů a v Evropě a USA je pravděpodobnou hlavní příčinou rostoucí incidence OPSCC (3). Proč u části infikovaných pacientů dojde k rozvoji chronické infekce a eventuálně

KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORA: MUDr. Vladimír Koucký, vladimir.koucky@fnmotol.cz

Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN Motol

V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

Cit. zkr: Onkologie 2021; 15(2): 67–72

Článek přijat redakcí: 5. 2. 2021

Článek přijat k publikaci: 20. 2. 2021

i vzniku nádorového bujení však není známo. Příznivým zjištěním je alespoň skutečnost, že pacienti s OPSCC asociovanými s HPV infekcí mají lepší prognózu onemocnění bez ohledu na použitou terapeutickou modalitu (4–6). Pětileté přežití je pozorováno u 80 % pacientů s HPV pozitivními nádory oproti pouhým 30 % pacientů s nádory indukovanými kouřením a konzumací alkoholu (7). Tento významný trend již ovlivnil 8. vydání mezinárodní TNM klasifikace zhoubných nádorů, kde nalezneme rozdílný staging pro p16 pozitivní a p16 negativní karcinomy orofaryngu. Expresí proteinu p16 a jeho imunohistochemická detekce u více než 70 % nádorových buněk je stanovena jako vysoce senzitivní a specifický marker HPV infekce. Je však nezbytné mít na paměti, že toto tvrzení platí pouze pro oblast orofaryngu, neboť k overexpresi p16 může dojít i vlivem spontánní či jinak indukované mutace a ne pouze působením HPV virových onkoproteinů E6 a E7 (8). Vysokou expresí proteinu p16 tak mohou vykazovat i jiné karcinomy hlavy a krku, u kterých ale tento nálezní neříká nic o asociaci nádoru s HPV. Za nejpřesnější metodu stanovení asociace nádoru s infekcí HPV lze považovat amplifikaci E6 a E7 mRNA transkriptů pomocí kvantitativní reverzní polymerázové řetězové reakce na vzorcích nativní nádorové tkáně, které je v současnosti pro rutinní využití v klinické praxi nepraktické a nákladné (9, 10).

Lepší prognóza pacientů s HPV+ OPSCC vedla i k diskuzím o deescalaci onkologické terapie, jejíž vysoká účinnost u této podskupiny pacientů je doprovázena významnými nežádoucími účinky a dlouhodobou morbiditou. Výsledky prvních velkých deeskalčních studií DeEscalate a RTOG 1016, kde byla u pacientů s lokálně pokročilým HPV+ OPSCC nahrazena konkomitantní chemoterapie platinovými deriváty cetuximabem, však ukázaly významné zhoršení přežívání u pacientů s redukcí léčby (11, 12). Přesné mechanismy, které jsou zodpovědné za lepší přežívání pacientů s HPV+ OPSCC, dosud nejsou spolehlivě objasněny. Současná data však poukazují na klíčovou roli protinádorové imunitní odpovědi. Práce Spanose et al. na myších modelech a buněčných liniích již v roce 2009 ukázala vyšší rezistenci HPV+ buněčných linií k radioterapii a účinkům cisplatinu ve sro-

vání s HPV- buňkami (13). Oproti tomu lepší terapeutický efekt výše zmíněných modalit u HPV+ tumorů se projevil *in vivo* na imunokompetentních myších, nikoli však u myší imunokompromitovaných, bez schopnosti T a B buněčné imunitní reakce. Samotná fyziologická imunitní odpověď ale není schopna zcela eradikovat již rozvinutý karcinom. Nádorové buňky využívají řady únikových mechanismů, díky kterým znesnadňují svoji identifikaci a likvidaci imunitním systémem. Mezi hlavní z nich patří redukce molekul MHC I, MHC II a dalších kostimulačních receptorů participujících na antigenní prezentaci, indukce populace T regulačních lymfocytů (Tregs), produkce imunosupresivních cytokinů či aktivace kaskád kontrolních bodů imunitního systému (14).

Klinický význam imunitního infiltrátu

Role imunitní odpovědi v kontrole nádorového bujení byla definována již v první polovině 20. století Paulem Ehrlichem. Až v posledních letech jsme svědky rozvoje nádorové imunologie, kdy došlo k přenosu teoretických poznatků v jejich klinické uplatnění. V roce 2018 byla udělena Nobelova cena za medicínu a fyziologii Johnu P. Allisonovi a Tasuku Honjovi za objev nádorové terapie pomocí inhibice negativní regulace imunitní odpovědi. Obrovský klinický úspěch terapie monoklonálními protilátkami blokujícími aktivaci kontrolních bodů imunitního systému (checkpoint inhibitory), především PD-1 (programmed cell death protein 1) a CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), dal základ moderní imunoterapii zhoubných nádorů. Indikace pro zmíněné léky se neustále rozšiřují a u řady chorob, jako je melanom či karcinom plic, se u selektovaných skupin pacientů staly velmi rychle standardem léčby (15, 16). U HNSCC imunoterapie checkpoint inhibitory ukázala významný posun v přežívání u pacientů s rekurentními či metastazujícími nádory, avšak terapeutické odpovědi jsou obvykle popisovány u méně než 20 % pacientů (17, 18). Tyto výsledky dávají naději, že modulace samotné protinádorové odpovědi může být účinným nástrojem i u pacientů s velmi pokročilým HNSCC. Další vývoj je však nezbytný a směřuje ke kombinaci různých

imunoterapeutických přístupů, jejich aplikaci u časnějších stadií onemocnění a jejich kombinace s klasickými léčebnými metodami. Námí provedená *in vitro* studie u HNSCC poukazují na možné využití kombinace vakcinace proti HPV a blokáce PD-1 spolu s TIM3 (T-cell immunoglobulin mucin 3), které by mohlo řešit reaktivní zvýšení exprese imunosupresivních molekul při monoterapii checkpoint inhibitory (19). Dalším slibným cílem z řady kontrolních bodů imunitního systému se jeví být LAG3 (Lymphocyte-activation gene 3) exprimovaný primárně na regulačních T lymfocytech a zprostředkovávající jejich aktivaci (20).

S úspěchem checkpoint inhibitorů přišel impuls i pro rozvoj dalších imunoterapeutických přístupů. Mezi základní metody lze zařadit adoptivní buněčný transfer, nádorové vakcíny, aplikace rekombinantních cytokinů a terapie pomocí onkolytických virů. Popis jednotlivých přístupů je nad rámec tohoto přehledu a žádný z těchto přípravků není schválen pro klinické využití u HNSCC. Vzhledem k narůstající incidenci HPV+ karcinomů však můžeme v rámci preventivních snah zmínit vakcinaci proti vysoce rizikovým kmenům HPV, která je v našich podmínkách schválena a hrazena pro prevenci karcinomu děložního čípku. Můžeme předpokládat ochranu i proti HNSCC, nicméně, vzhledem k datu počátku systematického očkování lze podrobnější data o efektivitě vakcíny očekávat nejdříve za 30–40 let (21).

Kromě vývoje samotných nových léčiv je neméně důležité i hledání biomarkerů, které by umožnily nové i stávající léčebné modality zacílit a zefektivnit. V tomto ohledu je rovněž role imunitního systému již dobře ukotvena a je nezpochybnitelné, že složení imunitního infiltrátu významně ovlivňuje prognózu onkologických pacientů. Typickým příkladem jsou práce týmu Jeroma Galona věnující se kolorektálnímu karcinomu. V tomto případě se ukázalo, že analýza zastoupení a lokalizace CD3+ a CD8+ T lymfocytů v nádorové tkáni může poskytnout přesnější informaci o pravděpodobnosti rekurence než je tomu u mezinárodní TNM klasifikace (22). Ačkoli u HNSCC zatím všeobecně přijímaná paralela zmíněného "immunoscore" neexistuje, z dostupných dat je zřejmé, že i zde je pozitivní vazba mezi přežíváním a zastoupením CD8+ T lymfocytů (23, 24).

Neimunitní součásti nádorového mikroprostředí

Před podrobnějším rozбором a definováním prognostické hodnoty jednotlivých imunitních buněčných populací u HNSCC je třeba zmínit, že procesy v nádorovém mikroprostředí nezahrnují pouze interakce mezi imunitním infiltrátem a nádorovými buňkami, ale jsou zde i další důležité buněčné a nebuněčné elementy, které hrají roli ve vzniku a progresi maligního tumoru. Jednou z hlavních složek nádorového stromatu jsou nádorově asociované fibroblasty (CAF, cancer-associated fibroblasts), které jsou schopny významně ovlivnit migrační aktivity nádorových buněk. U HNSCC jsou obecně přijímány za negativní prognostický faktor podporující invazi a metastazování nádoru (25). Vznikají transformací z přítomných nenádorových fibroblastů, mezenchymo-epiteliální transformací nádorových buněk či diferenciací mezenchymálních kmenových buněk migrujících do místa nádoru z kostní dřevě (26). CAF jsou producenty řady pleiotropních cytokinů a růstových faktorů jako jsou EGF (epidermal growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), BMP-4 (bone morphogenetic protein 4), IGF-2 (insulin-like growth factor 2), interleukiny 6 a 10 (IL-6, IL-10) či TGFβ (transforming growth factor β) a dále vytvářejí důležité komponenty extracelulární matrix, např. galektin 1 (27). U toho byla prokázána schopnost indukovat apoptózu u T lymfocytů (28). Dalšími složkami extracelulární matrix, u kterých byla *in vitro* zjištěna schopnost podporovat progresi zhoubných nádorů, jsou fibronectin 1, tenascin C či kyselina hyaluronová (27). Žádný z těchto poznatků dosud nenašel cestu ke klinickému uplatnění a jediným používaným přípravkem ze skupiny tzv. cílených léčiv, kromě diskutované imunoterapie, tak zůstává již v roce 2006 schválená anti-EGFR (epidermal growth factor receptor) chimerická monoklonální protilátka – cetuximab.

Další neméně důležitou nebuněčnou součástí nádorového mikroprostředí jsou cytokiny a chemokiny. Jako u dalších solidních tumorů je i u HNSCC patrný posun k Th2 cytokinové odpovědi (29). Významným zástupcem s pronádorovou aktivitou je IL-6, produkovány nádorovými buňkami, imunitním infiltrátem ale i CAF (27,30). U HNSCC byly jeho sérové

hladiny asociovány s negativní prognózou pacientů (31). Hojně zastoupenými cytokiny v nádorovém mikroprostředí HNSCC jsou i imunosupresivně působící IL-10 (32) a prozářlivý TNFα (33). Potenciál podpořit tvorbu metastáz a neoangiogenezi mají IL-8 a VEGF (vascular endothelial growth factor) (34). Tyto a další působky však mají zpravidla pleiotropní a tím i těžko predikovatelný efekt a s výjimkou užití rekombinantního IL-2 a interferonu α (IFNα) u melanomu a renálního karcinomu, se zatím v klinické praxi neuplatnily. Nicméně výzkum v této oblasti pokračuje a jedním z nejslibnějších kandidátů v léčbě solidních tumorů je IL-15, který aktivuje cytotoxické T lymfocyty a NK buňky, avšak nikoli Tregs (35).

Imunitní odpověď u HNSCC a prognostická hodnota tumor-infiltrujících leukocytů

Na protinádorové imunitní odpovědi se podílí jak adaptivní, tak nespecifické složky imunity. Ačkoli jsou dostupné práce ukazující prognostický význam imunitních buněk izolovaných z periferní krve (36, 37), přesnější obraz o stavu imunitní odpovědi nám dává studium na lokální úrovni nádorového mikroprostředí. HNSCC patří mezi nádory s nejvýraznějším imunitním infiltrátem a tento fenomén je ještě umocněn u HPV+ HNSCC (obrázek 1) (38). Řadíme je tak mezi tzv. imunologicky "horké" nádory. Výzkum už ale dávno překročil pouhou kvantifikaci imunitní odpovědi a zásadní otázkou se stalo kvalitativní složení imunitního infiltrátu a funkční stav jednotlivých buněčných populací. Typickým příkladem je často udávaný parametr poměru CD8+ a Tregs. U HNSCC můžeme najít pacienty s vysokým celkovým počtem infiltrujících T lymfocytů, ale s nižším poměrem CD8+ T lymfocytů / Tregs poukazující tak na vyšší míru imunosupresivních vlivů (39).

Míru lokální imunitní odpovědi lze předpokládat již na základě mutační nálože a HNSCC patří mezi nádory s vysokým počtem somatických mutací (40), ačkoli jejich spektrum se významně liší mezi HPV+ a HPV- nádory (41). U HPV+ HNSCC je nejčastějším nálezem alterace signální kaskády PIK3 (42). Amplifikace a aktivační mutace PIK3CA onkogenu identifikujeme u více než 20 % pacientů. Naproti tomu u více než 80 % HPV- HNSCC

nacházíme mutace v onkogenu TP53, které jsou však pouze vzácně zachyceny u HPV+ tumorů (41). Adaptivní T buněčná protinádorová odpověď je založena na schopnosti rozpoznat nádorové antigeny. Ty mohou být v těle standardně exprimovány, například ve tkáních jiné lokalizace než je daný tumor, a být tak imunitním dohledem částečně tolerovány, nebo mohou být produktem mutovaného genu v podobě tzv. neoantigenů (43). Tvorba neoantigenů je v přímé úměře s počtem somatických mutací, které korelují i s odpovědí na terapii checkpoint inhibitory u karcinomu plic a melanomu (43, 44). U solidních tumorů různé histologie byla detekce mikrosatelitní instability spojená s vyšší mutační náloží ověřena jako prediktor odpovědi na anti-PD-1 terapii a již dokonce schválena jako indikace podání anti-PD-1 protilátek v první linii léčby u neresekabilního kolorektálního karcinomu (45). Ve vztahu k HPV+ HNSCC byla detekována antigen-specifická imunitní reakce i proti proteinům HPV, které mohou být prezentovány na MHC glykoproteinech I. třídy na povrchu nádorových buněk. T lymfocyty specifické vůči virovým onkoproteinům E6 a E7 byly identifikovány v nádorové tkáni i periferní krvi u 64–75 % pacientů s HPV+ HNSCC a dávají teoretický podklad pro další vývoj terapeutických vakcín (19, 46).

V následujících odstavcích je stručně rozebírána role nejvýznamnějších imunitních populací infiltrujících nádorové mikroprostředí HNSCC. Tabulka 1 pak shrnuje prognostický význam těchto buněk u HPV+ a HPV- HNSCC na základě současného poznání.

T-lymfocyty

Jak již vyplývá z předchozích řádků, středobodem výzkumu i současných imunoterapeutických přístupů jsou cytotoxické CD8+ T lymfocyty. Jejich pozitivní prognostická role byla opakovaně potvrzena u řady nádorů včetně karcinomu dutiny ústní, hrtanu a orofaryngu (47–49). HPV+ HNSCC pak obsahují bohatší infiltrát CD8+ T lymfocytů a práce Warda et al. naznačuje, že vyšší zastoupení těchto buněk v nádorové tkáni může být zodpovědné za lepší prognózu HPV+ pacientů (50). V tomto prognostickém modelu podskupina HPV+ pacientů s malým lymfocytárním infiltrátem dokonce vykazovala stejné charak-

teristiky přežívání jako HPV- pacienti (50). Tyto poznatky podporují i současné klinické studie hodnotící odpověď pacientů na monoterapii inhibitory PD-1/PD-L1 kaskády, ve kterých HPV+ pacienti nevykazovali významně vyšší terapeutickou odpověď (17), avšak vyšší infiltrace nádorů CD8+ buňkami predikovala lepší odpověď na tuto terapii u rekurentního a metastatického HNSCC (51). V této práci byla navíc koexprese TIM3 a LAG3 spolu s PD-1 na CD8+ buňkách významně vyšší u pacientů bez odpovědi na terapii (51). V jedné z našich prací jsme popsali TIM3 jako významný marker vyčerpání T lymfocytů, jehož exprese je reaktivně zvýšena po blokádě PD-1 pomocí nivolumabu (19). Jedná se tak o slibný cíl budoucích imunoterapeutických protokolů.

V případě CD4+ T lymfocytů je definování jejich prognostické hodnoty o poznání složitější vzhledem k heterogenitě této buněčné populace. Jedná se o rozmanitou skupinu, kam spadají Th1, Th2, Th9 a Th17 buňky, folikulární T lymfocyty (Tfh) a Tregs. Vyšší zastoupení Tfh i Tregs u HPV+ HNSCC bylo popsáno na úrovni genové exprese v pracích Gameira a Cilla (52, 53). Na vyšším zastoupení tumor-infiltrujících Tregs, zpravidla definovaných expresí intracelulárního markeru FoxP3, u HPV+ nádorů se shoduje i řada prací založených na imunohistochemické analýze (23, 54), nicméně prognostická hodnota těchto buněk je rozporupná (25). Přes předpokládanou imunosupresivní roli v nádorovém mikroprostředí, kde regulují a modifikují aktivitu cytotoxických T lymfocytů, NK buněk či dendritických buněk, vyšší absolutní počty Tregs mohou značit imunologicky aktivnější nádory. Větší imunitní odpověď je totiž obvykle doprovázena také vyšší mírou imunosuprese. Nastavení lokální imunitní odpovědi tak pravděpodobně reflektuje spíše poměr počtu Tregs k počtům ostatních buněk imunitního infiltrátu, především pak k počtům CD8+ T lymfocytů (30).

B-lymfocyty

V nádorové imunologii byly tumor-infiltrující B lymfocyty dlouhou dobu relativně opomíjenou skupinou. V současnosti se ovšem objevují informace o jejich zásadní roli v nádorovém mikroprostředí a potenciálním imunoterapeutickém využití (55). Jejich úloha v protinádorové odpovědi spočívá pravděpodobně

v produkci protilátek schopných označit nádorové buňky jako cíl NK buněk a makrofágů, schopnosti prezentovat nádorové antigeny T lymfocytům a aktivovat je skrze signální dráhy CD40/CD40L a CD27/CD70 či produkci imunomodulačních cytokinů (56). V návaznosti na terapii checkpoint inhibitory Hollern et al. ukázali, že B lymfocyty zprostředkovaná aktivace T lymfocytů může být prediktorem odpovědi na léčbu (57). Prognostický význam B lymfocytů u HNSCC jsme zevrubně studovali v naší práci z roku 2019. Studie potvrzuje vyšší infiltraci B lymfocyty u HPV+ OPSCC a nachází pozitivní prognostický význam těchto buněk u OPSCC (49). Zároveň jsme definovali agregáty CD8+ T lymfocytů a B lymfocytů se zřejmým mezibuněčným kontaktem, jejichž četnost v nádorové tkáni pozitivně koreluje s prognózou pacientů (49). Na druhou stranu byla popsána i imunosupresivní populace tzv. B regulačních lymfocytů (Bregs), charakterizovaných produkcí IL-10 (58). Zhou et al. popsali pozitivní korelaci mezi jejich vyšším zastoupením v nádorové tkáni u karcinomu jazyka a horším přežíváním pacientů (59). I zde se tak potvrzuje potřeba přesného popisu fenotypu leukocytů infiltrujících nádorovou tkáň.

Dendritické buňky

Základními podskupinami dendritických buněk jsou myeloidní (mDC) a plasmacytoidní (pDC) dendritické buňky. Myeloidní DC jsou nejúčinnější buňky prezentující antigen, které exprimují vysoké hladiny MHC glykoproteinů a kostimulačních molekul nezbytných pro aktivaci T lymfocytů (60). Přes předpokládaný pozitivní vliv na protinádorovou imunitní odpověď, jejich prognostická hodnota u HNSCC není jasně definována. Jednou z příčin rozporupných výsledků může být i rozmanitost znaků používaných k identifikaci mDC. CD1a+ DC v okolí nádoru byly identifikovány jako pozitivní prognostický marker u karcinomu jazyka (61). Kindt et al. ukázali pozitivní prognostickou hodnotu stromálních CD1a+ Langerhansových buněk u HPV- HNSCC (62). V souladu s těmito pracemi jsou i data ukazující zhoršené přežívání pacientů s karcinomem laryngu a dutiny ústní s nižším zastoupením S100+ DC (63, 64). V našich pracích jsme v cytometrické analýze našli vyšší zastoupení CD45+LIN-HLA-DR+CD14-CD11c+ DC u HPV+ HNSCC (38), avšak v imu-

nohistochemické analýze pacientů s OPSCC nebyl významný rozdíl v počtech DC-LAMP+ DC mezi HPV+ a HPV- tumory (49). Stejně tak jsme nepozorovali korelaci s přežíváním pacientů. Studie založené na genové expresi pak rovněž neprokázaly vyšší zastoupení mDC u HPV+ HNSCC (52).

Plasmacytoidní DC jsou důležitou komponentou imunitní odpovědi na virová onemocnění a hlavním producentem IFN α v lidském těle. Ve vztahu k nádorům byla popsána především jejich negativní prognostická hodnota, snížená schopnost produkovat IFN α a indukce Tregs (65). Han et al. ve své imunohistochemické analýze vzorků orálního karcinomu popsali rovněž negativní prognostický význam pDC (66). V naší poslední práci jsme nepotvrdili prognostickou hodnotu pDC u HNSCC ani rozdílné zastoupení těchto buněk mezi HPV- a HPV+ tumory. Byli jsme ale schopni identifikovat významně sníženou funkční kapacitu pDC u HPV- nádorů asociovanou s produkcí cytokinů TNF α a IL-10 v nádorovém mikroprostředí (Koucký et al., Cancer Immunology, Immunotherapy, v tisku).

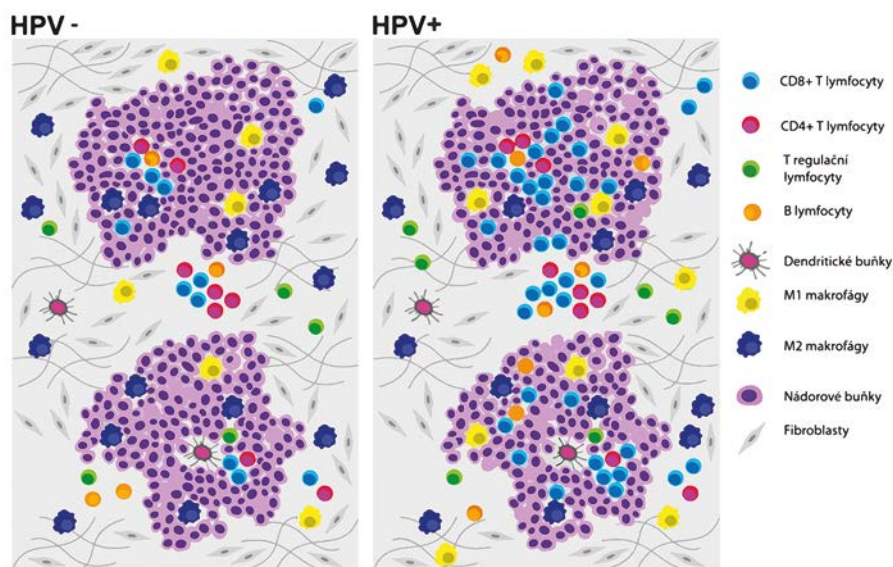
Buněčná složka neadaptivní imunitní odpovědi – neutrofilny, MDSC, makrofágy, NK buňky

Neutrofilní granulocyty hrají významnou roli v protibakteriální imunitě. U neutrofilů infiltrujících solidní nádory byla popsána spíše pronádorová aktivita v podobě podpory neoangioneze, metastazování a imunosuprese (25). U OPSCC byla publikována asociace mezi početnější infiltrací nádorové tkáně neutrofilny, pokročilejším T i N stadiem onemocnění a horším přežíváním pacientů (67). V práci Chena et al. byla popsána horší prognóza u pacientů s HPV+ HNSCC s vyšším zastoupením neutrofilů (68).

Myeloidní supresorové buňky (MDSC, myeloid-derived suppressor cells) jsou heterogenní skupinou nezralých buněk, které se přirozeně vyskytují v krevním řečišti, ale mohou migrovat do nádorového mikroprostředí a pod vlivem nádorových buněk expandovat (69). Tyto buňky podporují růst tumoru, ovlivňují efektorové funkce infiltrujících T lymfocytů a indukují aktivaci Tregs. U HNSCC byla popsána jejich kumulace v nádorovém mikroprostředí a jejich schopnost suprese efektorových T lymfocytů a NK buněk (30).

Tab. 1. Prognostický význam tumor-infiltrujících leukocytů u HNSCC v závislosti na HPV statusu (převzato a upraveno z Fialová et al., 2020 (30))

Znak	Prognostický význam u HPV- HNSCC	Prognostický význam HPV+ HNSCC	Reference
CD8+ T lymfocty	Pozitivní	Pozitivní	(23, 24, 49, 74)
CD4+ T lymfocty	Žádný	Žádný	(24, 68, 75)
Tregs	Nejednoznačný	Nejednoznačný	(76–80)
B lymfocty	NA	Pozitivní	(49)
IL-10+ Bregs	Negativní	NA	(59)
mDC	Pozitivní	Žádný	(61–64)
pDC	Negativní	NA	(66, 81)
Neutrofilý	Žádný	Negativní	(68)
MDSC	NA	NA	
Vysoký M1/M2 poměr	Pozitivní	Pozitivní	(68)
NK buňky	Pozitivní	NA	(73)

Obř. 1. Rozdílné zastoupení imunitních buněk u HPV+ a HPV- HNSCC. Schéma ukazuje počty imunitních buněk odpovídající jejich proporcionálnímu zastoupení u HPV+ a HPV- HNSCC dle současné literatury (převzato a upraveno z Fialová et al., 2020 (30))

Makrofágy mohou v nádorovém prostředí vykazovat pro i protinádorový efekt. Po aktivaci interferonem γ (IFN γ) polarizují do tzv. M1 makrofágů, vykazujících protinádorovou aktivitu. Při aktivaci makrofágů pomocí IL-4 či IL-10 dochází k polarizaci do populace M2 (70). M2 makrofágy podporují migraci Tregs do místa nádoru, produkují imunosupresivní cytokiny a snižují metabolickou aktivitu T lymfocytů prostřednictvím exprese arginázy-1. U HNSCC nacházíme převážně M2 makrofágy a jejich denzita po-

zitivně koreluje s horším přežíváním pacientů (71, 72). Významným parametrem se zdá být i poměr M1/M2, jehož pozitivní prognostická hodnota byla popsána u HPV+ i HPV- HNSCC (68). HPV asociované nádory pak vykazují vyšší zastoupení M1 oproti HPV- HNSCC (68).

NK buňky jsou považovány za efektorové buňky nespecifické imunity. Působí cytotoxicky především na buňky infikované viry a na buňky nádorové, na základě rozpoznání abnormální exprese MHC glykoproteinů I. třídy. Cytolytické

působení NK buněk může být zprostředkované expresí perforinu a granzymu B či indukcí apoptózy prostřednictvím Fas ligandu a molekuly TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Ve studii Wagnera et al. bylo popsáno významně vyšší zastoupení cytotoxických NK buněk u HPV+ HNSCC ve srovnání s HPV-tumory a prokázala se rovněž jejich pozitivní prognostická hodnota bez ohledu na HPV status (73). Tento nález potvrzují i další práce vycházející z veřejně dostupných TCGA (The Cancer Genome Atlas) databází (39).

Závěr

Nádorová imunologie se za posledních několik let vyvinula v disciplínu určující směr v onkologickém výzkumu a terapii. Byla popsána role řady imunitních buněk ve vztahu k průběhu nádorových onemocnění a terapeutická hodnota tumor-infiltrujících T lymfocytů. Relativně nízké léčebné odpovědi současné imunoterapie u HNSCC jsou ovšem příkladem toho, že nádorové mikroprostředí je velmi složitým systémem buněčných interakcí. Před velké množství dat, které nám onkologický výzkum přináší, před sebou máme ještě dlouhou cestu k tomu přesně popsat a pochopit veškeré procesy probíhající uvnitř nádoru. Nadějně terapeutické cíle a biomarkery vhodné pro stratifikaci pacientů jako jsou cytotoxické T lymfocytů či B lymfocytů infiltrující nádory, nejsou u HNSCC pevně ukotveny pro klinické využití. K tomuto účelu bude potřeba rozsáhlé multicentrické studie s jasně definovanými parametry analýzy pozorovaného znaku. Přesto je ze současného pohledu zřejmé, že podrobné studium nádorového imunitního infiltrátu bude důležitou součástí na cestě k personalizované onkologické terapii a k hledání nových léčebných postupů.

Vznik publikace byl podpořen z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 20J-08-00018 a grantovým projektem Progres Q28.

LITERATURA

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 394–424.
- Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and

- Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 541–550.
- Marur S, D'Souza G, Westra WH, et al. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* 2010; 11: 781–789.
- Fakhry C, Westra WH, Li S, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck

- squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 261–269.
- Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2010; 363: 24–35.
- Klozar J, Kratochvíl V, Salakova M, et al. HPV status and regional metastasis in the prognosis of oral and orophary-

ngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008; 265 Suppl 1, S75–82.

7. Chow LQM. Head and Neck Cancer *N Engl J Med* 2020; 382: 60–72.

8. Romagosa C, Simonetti S, Lopez-Vicente L, et al. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene* 2011; 30: 2087–2097.

9. Venuti A, Paolini F. HPV detection methods in head and neck cancer. *Head Neck Pathol* 2012; 6(Suppl. 1): S63–74.

10. Schache AG, Liloglou T, Risk JM, et al. Evaluation of human papilloma virus diagnostic testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: sensitivity, specificity, and prognostic discrimination. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 6262–6271.

11. Mehanna H, Robinson M, Hartley A, et al. Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* 2019; 393: 51–60.

12. Gillison ML, Trotti AM, Harris J, et al. Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): a randomised, multicentre, non-inferiority trial. *Lancet* 2019; 393: 40–50.

13. Spanos WC, Nowicki P, Lee DW, et al. Immune response during therapy with cisplatin or radiation for human papillomavirus-related head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2009; 135: 1137–1146.

14. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 267–296.

15. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363, 711–723.

16. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015; 373: 1627–1639.

17. Ferris RL, Blumenschein G, Jr., Fayette J, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 2016; 375: 1856–1867.

18. Cohen EEW, Soulieres D, Le Tourneau C, et al. Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2019; 393: 156–167.

19. Hladikova K, Partlova S, Koucky V, et al. Dysfunction of HPV16-specific CD8+ T cells derived from oropharyngeal tumors is related to the expression of Tim-3 but not PD-1. *Oral Oncol* 2018; 82: 75–82.

20. Deng WW, Mao L, Yu GT, et al. LAG-3 confers poor prognosis and its blockade reshapes antitumor response in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* 2016; 5: e1239005.

21. Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, et al. Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 2015; 33: 3235–3242.

22. Pages F, Mlecnik B, Marliot F, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet* 2018; 391: 2128–2139.

23. Nasman A, Romanitan M, Nordfors C, et al. Tumor infiltrating CD8+ and Foxp3+ lymphocytes correlate to clinical outcome and human papillomavirus (HPV) status in tonsillar cancer. *PLoS One* 2012; 7: e38711.

24. Nordfors C, Grun N, Tertipis N, et al. CD8+ and CD4+ tumour infiltrating lymphocytes in relation to human papillomavirus status and clinical outcome in tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2013; 49: 2522–2530.

25. Wondergem NE, Nauta IH, Muijlwijk T, et al. The Immune Microenvironment in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: on Subsets and Subsites. *Curr Oncol Rep* 2020; 22: 81.

26. Novak S BV, Mifkova A, et al. Nádorové mikroprostředí. *Otorinolaryng. a Foniát. /Prague/* 2019; 68: 41–51.

27. Plzak J, Boucek J, Bandurova V, et al. The Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Microenvironment as a Potential Target for Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* 2019; 11.

28. Deak M, Hornung A, Novak J, et al. Novel role for galectin-1 in T-cells under physiological and pathological conditions. *Immunobiology* 2015; 220: 483–489.

29. Lathers DM, Achille NJ, Young MR. Incomplete Th2 skewing of cytokines in plasma of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Hum Immunol* 2003; 64: 1160–1166.

30. Fialova A, Koucky V, Hajduskova M, et al. Immunological Network in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma—A Prognostic Tool Beyond HPV Status. *Front Oncol* 2020; 10: 1701.

31. Duffy SA, Taylor JM, Terrell JE, et al. Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. *Cancer* 2008; 113: 750–757.

32. Chandler SW, Rassekh CH, Rodman SM, et al. Immunohistochemical localization of interleukin-10 in human oral and pharyngeal carcinomas. *Laryngoscope* 2002; 112: 808–815.

33. Parks RR, Yan SD, Huang CC. Tumor necrosis factor-alpha production in human head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 1994; 104: 860–864.

34. Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, et al. Expression of pro-inflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1369–1379.

35. Steel JC, Waldmann TA, Morris JC. Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33: 35–41.

36. Boucek J, Mrkvan T, Chovanec M, et al. Regulatory T cells and their prognostic value for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Cell Mol Med* 2010; 14: 426–433.

37. Lukesova E, Boucek J, Rotnaglova E, et al. High level of Tregs is a positive prognostic marker in patients with HPV-positive oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 303929.

38. Partlova S, Boucek J, Kloudova K, et al. Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* 2015; 4: e965570.

39. Mandal R, Senbabaoglu Y, Desrichard A, et al. The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. *JCI Insight* 2016; 1: e89829.

40. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013; 500: 415–421.

41. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 9–22.

42. Nichols AC, Palma DA, Chow W, et al. High frequency of activating PIK3CA mutations in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2013; 139: 617–622.

43. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 2015; 348: 69–74.

44. Zhao P, Li L, Jiang X, et al. Mismatch repair deficiency/microsatellite instability-high as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy efficacy. *J Hematol Oncol* 2019; 12: 54.

45. Andre T, Shiu KK, Kim TW, et al. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2020; 383: 2207–2218.

46. Heusinkveld M, Goedemans R, Briet RJ, et al. Systemic and local human papillomavirus 16-specific T-cell immunity in patients with head and neck cancer. *Int J Cancer* 2012; 131: E74–85.

47. Fang J, Li X, Ma D, et al. Prognostic significance of tumor infiltrating immune cells in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2017; 17: 375.

48. Hoesli R, Birkeland AC, Rosko AJ, et al. Proportion of CD4 and CD8 tumor infiltrating lymphocytes predicts survival in persistent/recurrent laryngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2018; 77: 83–89.

49. Hladikova K, Koucky V, Boucek J, et al. Tumor-infiltrating B cells affect the progression of oropharyngeal squamous cell carcinoma via cell-to-cell interactions with CD8(+) T cells. *J Immunother Cancer* 2019; 7: 261.

50. Ward MJ, Thirdborough SM, Mellows T, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. *Br J Cancer* 2014; 110: 489–500.

51. Hanna GJ, Lizotte P, Cavanaugh M, et al. Frameshift events predict anti-PD-1/L1 response in head and neck cancer. *JCI Insight* 2018; 3.

52. Gameiro SF, Ghasemi F, Barrett JW, et al. Treatment-naive HPV+ head and neck cancers display a T-cell-inflamed phenotype distinct from their HPV – counterparts that has implications for immunotherapy. *Oncoimmunology* 2018; 7: e1498439.

53. Cillo AR, Kurten CHL, Tabib T, et al. Immune Landscape of Viral – and Carcinogen-Driven Head and Neck Cancer. *Immunity* 2020; 52: 183–199 e189.

54. Russell S, Angell T, Lechner M, et al. Immune cell infiltration patterns and survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck Oncol* 2013; 5: 24.

55. Wouters MCA, Nelson BH. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating B Cells and Plasma Cells in Human Cancer. *Clin Cancer Res* 2018; 24: 6125–6135.

56. Sarvaria A, Madrigal JA, Saudeumont A. B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cell Mol Immunol* 2017; 14: 662–674.

57. Hollern DP, Xu N, Thennavan A, et al. B Cells and T Follicular Helper Cells Mediate Response to Checkpoint Inhibitors in High Mutation Burden Mouse Models of Breast Cancer. *Cell* 2019; 179: 1191–1206 e1121.

58. Schwartz M, Zhang Y, Rosenblatt JD. B cell regulation of the anti-tumor response and role in carcinogenesis. *J Immunother Cancer* 2016; 4: 40.

59. Zhou X, Su YX, Lao XM, et al. CD19(+)IL-10(+) regulatory B cells affect survival of tongue squamous cell carcinoma patients and induce resting CD4(+) T cells to CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *Oral Oncol* 2016; 53: 27–35.

60. Plzak J, Holikova Z, Smetana K, Jr., et al. The role of dendritic cells in the pharynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003; 260: 266–272.

61. Goldman SA, Baker E, Weyant RJ, et al. Peritumoral CD1a-positive dendritic cells are associated with improved survival in patients with tongue carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 124: 641–646.

62. Kindt N, Descamps G, Seminerio I, et al. Langerhans cell number is a strong and independent prognostic factor for head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2016; 62: 1–10.

63. Reichert TE, Scheuer C, Day R, et al. The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 2136–2147.

64. Gallo O, Libonati GA, Gallina E, et al. Langerhans cells related to prognosis in patients with laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991; 117: 1007–1010.

65. Koucky V, Boucek J, Fialova A. Immunology of Plasmacytoid Dendritic Cells in Solid Tumors: A Brief Review. *Cancers (Basel)* 2019; 11.

66. Han N, Zhang Z, Liu S, et al. Increased tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol* 2017; 78: 129–134.

67. Trellakis S, Bruderek K, Dumitru CA, et al. Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *Int J Cancer* 2011; 129: 2183–2193.

68. Chen X, Yan B, Lou H, et al. Immunological network analysis in HPV associated head and neck squamous cancer and implications for disease prognosis. *Mol Immunol* 2018; 96: 28–36.

Literatura u autora
a na www.onkologics.cz