

A mikrokörnyezet és a tumor kölcsönhatásainak szerepe a melanóma progressziójában, különös tekintettel a tumort infiltráló immunsejtek jelentőségére

Doktori tézisek

Dr. Mohos Anita

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Ladányi Andrea Ph.D, laboratórium vezető

Hivatalos bírálók: Dr. Holló Péter Ph.D, egyetemi docens
Dr. Andrikovics Hajnalka Ph.D, laboratórium vezető

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina Ph.D, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Simon Károly Ph.D, osztályvezető főorvos
Dr. Hidvégi Bernadett, Ph.D. egyetemi adjunktus

Budapest
2015

1. BEVEZETÉS

A melanóma a velőcső-eredetű melanociták rosszindulatú burjánzása. Túlnyomórészt a bőrből kiinduló daganat. Klinikai megjelenése változatos, kórlefolyása kedvezőtlen és gyakran kiszámíthatatlan, áttétképző tulajdonsága kifejezett. Gyakorisága világszerte és Európában is jelentősen emelkedett.

A bőr malignus melanómáját tartják az egyik legimmunogénebb humán daganatnak, gyakran igen kifejezett immunsejtes infiltráció jellemzi, ennek ellenére igen rossz a prognózisa. A melanómák szerves részét képező gazdaszervezeti sejtek, ezen belül a veleszületett és adaptív immunválasz létrehozásában közreműködő sejtek pozitív és negatív hatást is gyakorolhatnak a betegség kimenetelére. A hatékony immunválasz kialakulása csökkenti a daganatok progressziójának, metasztázisaik kialakulásának valószínűségét, így a betegség kimenetelét kedvezően befolyásolja. Az immunsejtes infiltrátum prognosztikai szerepét tanulmányoztuk melanómákban.

1.1. A melanómákat infiltráló immunsejtek

A gyulladásszerű és immunreakciók képesek mind pro-, mind antitumorális hatást kifejteni. Egyre nagyobb figyelem övezi a lokális, a daganat területére jellemző immunaktivitást, amelyről az infiltráló immunsejtek vizsgálata nyújthat információt. A melanómák immuninfiltrátumában mind a veleszületett (mononukleáris fagociták, dendritikus sejtek, granulociták, hízósejtek, NK-sejtek), mind az adaptív immunrendszer sejtjei (T-limfociták, B-limfociták) megtalálhatóak. A sejtek egy részét inkább immunszuppresszív tulajdonságúnak tartják, mint a $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ regulátor T-sejtek, $CD4^+$ Th2 helper T-sejtek, mieloid-eredetű szuppresszor sejtek (MDSC), M2 makrofágok, N2 neutrofilek, plazmacitoid dendritikus sejtek, más részük pedig főként antitumorális hatású, mint a $CD8^+$ citotoxikus T-limfociták, Th1 helper T-limfociták, az antigénprezentáló dendritikus sejtek, M1 makrofágok és N1 neutrofilek.

A tumorok progressziója gyakran megfigyelhető kifejezett limfoid infiltrátum jelenlétében is. Fontos a sejtek prognosztikai jelentőségének meghatározásakor az alcsoportok elkülönítése mellett a funkcionális és aktiváltsági állapotot is jellemezni.

1.2. Az őrszem nyirokcsomók immunológiai sajátosságai és ezek prognosztikai alkalmazhatósága

Melanómás betegeknél a szentinel nyirokcsomók (SLN) érintettségének patológiai meghatározása jó prognosztikai jelző a túlélés szempontjából. Az őrszem nyirokcsomók immunkompetenciája jelenleg még vita tárgyát képezi. Viszonylag kevés közlemény célozta a szentinel nyirokcsomók immunstátusza meghatározásának prognosztikai alkalmazhatóságát, illetve a potenciális összefüggéseket a klinikopatológiai tényezők és az immunsejtek denzitása között.

1.3. Hormonális tényezők

Számos tumortípus mutat nemenként különböző viselkedést, jelezve ezzel az endokrin faktorok lehetséges szerepét a betegség kimenetelében.

Munkacsoportunk egy korábbi tanulmányában magasabb májkolonizáló potenciált írt le hím SCID egerekben emberi melanómasejtek lépbe történő oltása után. Vizsgálataink alapján a nemi különbség szervspecifikus és a májra korlátozódik. A jelenség hátterét vizsgálva azonban humán melanómasejtekben sem fehérje-, sem mRNS-szinten nem tudunk számottevő nemihormon-receptor expressziót kimutatni. *In vitro* kísérletekben a nemi hormonok nem befolyásolták sem a proliferációt, sem a mátrixadhéziót. A direkt hormonhatás hiánya miatt felmerült a gazdaszervezeti sejtek befolyásolásán keresztüli hatás lehetősége.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során az immunsejteknek a malignus melanóma progresszióját befolyásoló szerepét vizsgálva a következő kérdésekre kerestünk választ:

1. A primer melanómát infiltráló egyes sejttípusok, mint a DC-LAMP⁺ érett dendritikus sejtek, a CD20-at expresszáló B-limfociták, és a T-limfociták egy alcsoportja, a FOXP3⁺ regulátor T-sejtek mennyisége összefügg-e a klinikopatológiai paraméterekkel és a betegség kimenetelével?

2. Vajon az őrszem nyirokcsomókban a különböző immunsejttípusok, mint az OX40⁺ aktivált T-limfociták, DC-LAMP⁺ érett dendritikus sejtek, illetve a FOXP3⁺ regulátor T-sejtek és CD123⁺ plazmacitoid dendritikus sejtek jelenléte prognosztikus lehet-e a tumor progressziójára és a betegek túlélésére vonatkozóan?

3. Van-e jelentősége a gazdaszervezet nonspecifikus védekező rendszerének, ezen belül a makrofágoknak és az NK-sejteknek az egérkísérletek során a májban észlelt nemek közti áttétképző különbség kialakulásában?

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

Beteganyag-jellemzők

1980 és 2001 között a Semmelweis Egyetem Bőr- és Nemikórtani Klinikán és az Országos Onkológiai Intézetben primer kután melanóma miatt sebészeti műtéten átesett betegek archivált szövettani mintáján végeztük a tanulmányokat: a dendritikus sejtek vizsgálatát 82, a B-sejteket 106, a FOXP3⁺ regulátor T-limfocitákat 97 eseten. Az őrszem nyirokcsomók tanulmányozásához 60 primer kután melanómás betegből származó 100 szentinel nyirokcsomó szövettani mintáját vizsgáltuk. A betegek nem kaptak semmiféle daganatellenes kezelést a műtét előtt. A tumorokat vastagságuk szerint 4 csoportba osztottuk ($\leq 1,0$, 1,01–2,0, 2,01–4,0, $>4,0$ mm), illetve három kategóriába soroltuk a betegség progressziójától függően (az 5 éves követési idő alatt nem volt metasztázis, csak regionális nyirokcsomóáttét volt, távoli szervi áttét is volt). Minden beteg tumorát éppben távolították el. A túlélő betegeket legalább 5 éven keresztül követtük, az ezidő alatt elveszített betegek a melanóma és szövődményei miatt haláloztak el.

Az infiltráló sejtek immunhisztokémiai kimutatása melanómamintákban

A vizsgálatoknál a következő primer ellenanyagokat használtuk: eger monoklonális anti-CD1a, anti-DC-LAMP, anti-CD45RO, anti-CD20cy, anti-FOXP3, anti-CD134, anti-CD123, anti-CD25, anti-CD21. Az esetek egy részén kettős jelölést is végeztünk a dendritikus sejtek (CD1a, DC-LAMP) vagy B-sejtek (CD20) és az aktivált T-limfociták (CD25, CD134) együttes kimutatására. A primer antitesteknek megfelelő másodlagos ellenanyag és detekciós rendszer alkalmazását követően 3-amino-9-etilkarbazol, ill. a kettős jelöléseknél Vector SG és fukszin kromogénnel tettük láthatóvá az immunreakciókat.

Az immunreakciók kiértékelése

A primer melanómák esetében az egész tumoros területet értékeltük, és sejt/mm²-ben adtuk meg a denzitásértéket. Az infiltráló sejteket külön regisztráltuk intratumorálisan (a melanómasejtfészkeket infiltrálók) és peritumorálisan (a tumornak a széli és a

bazális részén elhelyezkedő infiltrátum). Az egyes sejttípusokra denzitási küszöbértéket az adott változónak a teljes vizsgált csoportra vonatkozó középértéke alapján állítottunk be, esetenként kis módosításokkal. Az intra- és peritumorális sejtsűrűségekre külön küszöbértékeket alkalmaztunk és ennek alkalmazásával meghatároztuk azon betegek csoportját, akiknek az átlagos sejtdenzitásértékei a küszöbérték felett voltak. A T-sejt-aktivációs markerek denzitási eredményei munkacsoportunk korábbi vizsgálatából származtak.

A szentinel nyirokcsomók vizsgálatánál az 5 legnagyobb pozitív sejt denzitású területen számoltuk le a jelölt sejteket 400x-os nagyítás mellett. Azoknál a betegeknél, akiknél egynél több SLN-minta volt hozzáférhető, az összes SLN-ből származó átlagértéket regisztráltuk. Minden markerre küszöbértéket számoltunk.

Kísérleti modell: a nemi különbség az áttétképzésben

Sejtvonalak

A HT168-M1 és HT199 humán melanómavonalakat valamint a B16 egér melanómasejteket 37°C-on, 5% CO₂-t tartalmazó atmoszférában, RPMI 1640 tápfolyadékban tartottuk fenn, ami 5% főtális borjúsavót és 50 µl/ml gentamycint tartalmazott.

Citotoxicitási teszt

8-10 hetes hím és nőstény SCID egerekből nyertünk lépsejteket. Az egereket 1 nappal a sejtek begyűjtése előtt poliinozin-policitidinsavval (poli(I:C)) kezeltük. A célsejteket (HT168-M1 melanóma) együtt tenyésztettük a lépsejtekkel, 100:1, 50:1, 25:1 és 12,5:1 effektor:target arány mellett. A citotoxicitás mérésére LDH-kibocsátási tesztet alkalmaztunk.

Állatok

A C57BL/6, SCID (CB17/*icr-Prkdc^{scid}*) és NOD/SCID IL2R γ ^{null} (NSG; NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tmlWfi}/SzJ) egereket az Országos Onkológiai Intézet patogénmentes állatházában nevelték. Az állatkísérleteket a publikált daganatkutatási útmutatók szerint végeztük; a kísérleti protokollt az Országos Onkológiai Intézet munkahelyi állatvédelmi bizottsága engedélyezte.

Májkolonizáció

A melanómasejteket az egerek lépébe oltottuk. A kísérleteket 22–29 (HT168-M1), illetve 16 (B16) nappal a tumorsejtek beoltása után zártuk le. Az állatok lépének és májának tömegét megmértük, majd 4%-os formalinban fixáltuk. A felszíni májkolóniákat sztereomikroszkóp alatt számoltuk meg. A Kupffer-sejteket és NK-sejteket blokkoló kísérletekben 1 nappal a melanómasejtek beoltása előtt $GdCl_3$ -at, illetve anti-asialo GM1 antitestet adtunk intraperitoneálisan fiziológiás sóoldatban, kontrollként fiziológiás sóoldatot használva. A májkolonizáció kinetikájának meghatározására 5×10^5 HT168-M1 sejtet oltottunk SCID egerek lépébe, majd az állatokat 1 órával, 1 nappal, illetve 1 héttel az oltás után vizsgáltuk. Az egerek máját 4%-os formalinban fixáltuk, majd szövetségi feldolgozásukat követően a Ki-67 antigén immunhisztokémiai kimutatásával az aktív, osztódó melanómasejtek 1 mm^2 -re eső denzitását fénymikroszkóppal határoztuk meg.

Tüdőkolonizáció

SCID egerek farokvénájába 10^6 melanómasejtet oltottunk. Oltás után 6 héttel a kísérletet lezártuk, az állatok tüdejét 4%-os formalinban fixáltuk, majd a felszíni kolóniák számát sztereomikroszkóp alatt meghatároztuk.

Intrakardiális oltás

A hím és a nőstény egereket sebészi úton kasztráltuk (orchidektómia, ovariectómia). A kontroll egerek álműtétnek lettek kitéve. A műtét után 2-4 héttel 10^6 életképes tumorsejtet oltottunk a szív bal kamrájába. A kísérleteket a tumorsejtek beoltása után 3-4 héttel fejeztük be. Eltávolítottuk, majd 4%-os formalinban fixáltuk a májat, agyat, szívet, tüdőt, veséket, mellékveséket és a combcsontot. A májkolóniák számát sztereomikroszkóp alatt, a többi szerv áttéteinek számát fénymikroszkóppal határoztuk meg.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A primer tumort infiltráló dendritikus sejtek jelentősége

$CD1a^+$ dendritikus sejteket hasonló számban találtunk a melanómasejt-fészkekben és a stromális területen, míg a $DC\text{-LAMP}^+$ markert hordozó érett dendritikus sejtek eloszlása jórészt a peritumorális területre korlátozódott. A $CD1a^+$ DC-k peritumorális

és intratumorális, és a DC-LAMP⁺ érett dendritikus sejtek peritumorális infiltrációja erős fordított összefüggést mutatott a tumorvastagsággal.

Az általunk elemzett primer melanómák DC-denzitásában nem találtunk eltérést, mikor a tumorokat szövettani típusuk, lokalizációjuk, avagy a betegek életkora, neme szerint különböztettük meg. A kifehélyesedő tumorok alacsonyabb számú infiltráló DC-t tartalmaztak, valószínűleg a vastagabb tumorokban észlelhető nagyobb kifehélyesedési tendenciának köszönhetően. A követési idő alatt vizszerális metasztázist adó daganatokat alacsonyabb peritumorális DC-denzitás jellemezte. A kifejezett peritumorális DC-infiltráció, főként a DC-LAMP-ot expresszáló érett dendritikus sejteké, hosszabb beteg túléléssel függött össze.

Munkacsoportunk egy korábbi munkája elemezte melanómákban a CD25, ill. OX40 aktivációs markert hordozó T-limfociták prognosztikus értékét. A dolgozatomban tárgyalt vizsgálataink a DC-k és az aktivált T-limfociták denzitása között szignifikáns korrelációt mutattak ki. E sejttípusok mennyiségének kombinált elemzése szerint együttes magas peritumorális denzitásuk jó túlélési potenciált jelentett. A DC-LAMP^{magas}/OX40^{magas} kombináció a prognózis szignifikáns független prediktorának bizonyult.

4.2. A primer tumort infiltráló B-limfociták jelentősége

106 fős mintánk nagy részében jelentős számú B-limfocitát találtunk főként a peritumorális infiltrátumban, míg a tumorsejtfészkekben jelenlétük igen csekély volt. A CD20⁺ limfociták száma nem mutatott összefüggést a tumorparaméterekkel, egyetlen kivételtől eltekintve: a törzsi és feji lokalizációjú melanómák között gyakrabban fordultak elő szignifikáns peritumorális B-sejtes infiltrátumot tartalmazó minták, mint a végtagiak esetén.

A B-limfociták denzitása ezzel szemben (mind intra-, mind peritumorális lokalizációban) korrelált a betegek túlélésével. Értékeljük a B-sejtek és aktivált T-limfociták denzitásértékei kombinációjának a prognosztikus hatását is, ami jelentősen különböző túlélésű betegcsoportokat eredményezett; az alacsony B- és egyidejűleg alacsony aktivált T-sejt-denzitás kirívóan rossz prognózist vetített elő.

4.3. A primer tumort infiltráló FOXP3⁺ regulátor T-sejtek jelentősége

A FOXP3⁺ sejtek előfordulása a melanómamintákban sokkal gyakoribb volt a stróma limfocitagazdag területein, mint a tumorsejtfészkekben. Mennyiségük azonban nem mutatott összefüggést egyetlen tanulmányozott klinikopatológiai paraméterrel (a beteg életkora, neme, tumorvastagság, lokalizáció, szövettani típus, kifeléyesedés) és a betegség kimenetelével sem.

4.4. A különböző immunsejttípusok jelentősége a szentinel nyirokcsomókban

Retrospektív tanulmányunkban több immunsejttípus denzitását vizsgáltuk malignus melanómában szenvedő betegek őrszem nyirokcsomóiban: OX40⁺ aktivált T-limfocitákat, FOXP3⁺ regulátor T-sejteket, DC-LAMP⁺ érett dendritikus sejteket és CD123⁺ plazmacitoid dendritikus sejteket. Az eredményeket a beteg- és tumorparaméterekkel, valamint a betegség kimenetelével összefüggésben értékeltük.

Beteganyagunkban a DC-LAMP⁺ érett dendritikus sejtek, a CD123⁺ pDC-k és az OX40⁺ aktivált T-sejtek őrszem nyirokcsomókban meghatározott mennyisége nem mutatott szignifikáns összefüggést a betegség progressziójával vagy a túléléssel. A FOXP3⁺ T-limfociták magas átlagos denzitása ezzel szemben szignifikánsan rövidebb progressziómentes és teljes túléléssel járt. Tanulmányunk új és érdekes megfigyelése, hogy a FOXP3⁺ sejtek magas SLN-átlagdenzitása csak a pozitív szentinelstátuszú betegekben mutatott összefüggést a betegség kimenetelével.

4.5. Kísérleti modell: a nemi különbség az áttétképzésben

Munkacsoportunk korábbi, a HT168 és HT199 melanóma-sejtvonalakkal végzett kísérleteinek eredményeit megerősítette a kifejezett metasztatikus képességgel bíró HT168-M1 sejtek lépbe oltásának eredménye, amennyiben megdöbbentő különbséget észleltünk hím és nőtény SCID egerek között a kialakult májkolóniák számában.

Nem találtunk nemi különbséget a primer tumor tömegében lépbeoltást követően, sem a tüdőkolóniák számában HT168-M1 melanómasejtek intravénás oltását követően. Az intrakardiális oltás számos szervben kolóniaképzést eredményezett, azonban csak a májban észleltünk különbséget a két nem között: több kolóniát találtunk a hímekben a nőtényekhez képest, és az orchidektómia csökkentette, az ovariektómia pedig növelte ezek számát.

Vizsgálataink szerint a májkolonizációban észlelt nemi különbség a tumorsejtek beoltását követő első napon megjelent, amikor a májban a Ki-67⁺ proliferáló melanómasejtek száma a hímeiben harmadára, míg a nőstényekben nyolcadára csökkent. A 7. napon talált mikroszkopikus kolóniák száma megközelítően megegyezett az első napon Ki-67-pozitivitást mutató sejtek számával, azt sugallva, hogy a legtöbb proliferáló melanómasejt képes volt kolóniaképzésre.

A proliferáló melanómasejtek mennyiségének az oltást követő első napon megfigyelt csökkenése a gazdaszervezet védekező mechanizmusainak szerepét veti fel. Szintén a gazdaszervezet befolyásolásán keresztül indirekt hatást valószínűsíti az a tény, hogy a nemi hormonok direkt módon nem befolyásolták a melanómasejteket. Mivel a természetes immunrendszer elemei megtalálhatóak a SCID egerekben, azt feltételeztük, hogy a Kupffer-, vagy NK-sejtek tehetők felelőssé a tumorsejtek gyors eliminációjáért. Mindkét sejttypusról leírták, hogy gátolja a májmetasztázisok kialakulását és növekedését.

Kísérleteinkben az állatok előkezelése a Kupffer-sejteket gátló gadolínium-kloriddal a HT168-M1 sejteknek a két nemben egyforma mértékben fokozódó májkolóniaképzésével járt, az NK-sejtek aktivitásának gátlása azonban nagyobb hatást gyakorolt nőstény egerekben, mint hímeiben. Ez azt sugallja, hogy az NK-sejtek szerepet játszanak a májbéli kolóniaképző tulajdonság hatáskörében észlelt, nemek közötti különbségben, legvalószínűbben azzal, hogy hozzájárulnak a disszeminált tumorsejtek eliminációjához. Az NK-sejtek szerepét támogatta a nemek közötti különbség hiánya NSG egerekben, amelyek NK-aktivitásra nézve deficiensek. Az NK-sejtek lehetséges *in vitro* hatását vizsgálva citotoxicitási tesztet végeztünk poli(I:C)-aktivált lépsejtekkel a HT168-M1 melanómasejtekkel szemben, ami a nőstények lépsejtjeinek magasabb effektor citotoxikus aktivitását mutatta.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A primer melanómák területén az infiltráló immunsejtek esetében a DC-LAMP⁺ érett dendritikus sejtek nagy mennyisége szignifikánsan jobb prognózissal függött össze. A leghatékonyabb antigénprezentáló sejtnak tartott dendritikus sejtek és az aktivált T-limfociták együttes magas denzitása a jó prognózis szignifikáns független prediktorának bizonyult.

A B-sejtes infiltrátum mennyisége, illetve a B-sejtek és aktivált T-limfociták együttes jelenléte és a prognózis között szintén pozitív kapcsolatot találtunk. A B-sejtek alacsony peritumorális denzitása kombinálva alacsony aktivált T-sejtszámmal a rossz prognózis szignifikáns független előjelzője volt.

2. A FOXP3⁺ regulátor T-sejteknek melanómás betegek őrszem nyirokcsomóiban meghatározott magas átlagos denzitása a szentinel-pozitív esetek alcsoportjában a betegség progressziójával és rövidebb túlélési idővel mutatott összefüggést, azonban e sejtek szentinel-negatív betegek őrszem nyirokcsomóiban, illetve a primer melanómákban mért denzitása esetében nem találtunk kapcsolatot a túléléssel.

A többi vizsgált immunsejttípus: az OX40⁺ aktivált T-limfociták, a DC-LAMP⁺ érett dendritikus sejtek és a CD123⁺ plazmacitoid dendritikus sejtek mennyisége a szentinel nyirokcsomókban nem mutatott prognosztikus szignifikanciát.

3. Preklinikai modellben a humán melanómasejtek magasabb arányú kolóniaképzését figyeltük meg hím SCID egerekben a nőstényekhez képest a májban, de a többi szervben nem. A nemi különbség már a kolóniaképzés korai szakaszában megjelent. Az NK-sejtek lehetséges szerepére utal, hogy gátlásuknak a hatása erősebb volt a nőstény egerekben, továbbá az NK-aktivításra nézve deficiens NSG egereken végzett kísérletekben nem észleltünk különbséget a hímek és nőstények között a melanómasejtek májkolonizációs képességében.

6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

Ladányi A, Sebestyén T, **Mohos A**, Liskay G, Somlai B, Tóth E, Tímár J: **Ectopic lymphoid structures in primary cutaneous melanoma**. Pathol Oncol Res 2014 20:981-985. IF: 1,806*

Dobos J, **Mohos A**, Tóvári J, Rásó E, Lőrincz T, Zádori G, Tímár J, Ladányi A: **Sex-dependent liver colonization of human melanoma in SCID mice – role of host defense mechanisms**. Clin Exp Metastasis 2013 30:497-506. IF: 3,725

Mohos A, Sebestyén T, Liskay G, Plótár V, Horváth S, Gaudi I, Ladányi A: **Immune cell profile of sentinel lymph nodes in patients with malignant melanoma – FOXP3+ cell density in cases with positive sentinel node status is associated with unfavorable clinical outcome**. J Transl Med 2013 11:43. IF: 3,991

Ladányi A, Kiss J, **Mohos A**, Somlai B, Liskay G, Gilde K, Fejős Z, Gaudi I, Dobos J, Tímár J: **Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma**. Cancer Immunol Immunother 2011 60:1729-1738. IF: 3,701

Ladányi A, **Mohos A**, Somlai B, Liskay G, Gilde K, Fejős Z, Gaudi I, Tímár J: **FOXP3(+) cell density in primary tumor has no prognostic impact in patients with cutaneous malignant melanoma**. Pathol Oncol Res 2010 16:303-309. IF: 1,483

Ladányi A, Kiss J, Somlai B, Gilde K, Fejős Z, **Mohos A**, Gaudi I, Tímár J: **Density of DC-LAMP+ mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor**. Cancer Immunol Immunother 2007 56:1459-1469. IF: 3,728