

# Immunoscore a jeho prediktivní hodnota u kolorektálního karcinomu

## Immunoscore and Its Predictive Value for Colorectal Cancer

Závadová E.<sup>1</sup>, Špaček J.<sup>1</sup>, Vočka M.<sup>1</sup>, Konopásek B.<sup>1</sup>, Fučíková T.<sup>2</sup>, Netíková I.<sup>1,3,4</sup>, Dundr P.<sup>5</sup>, Skálová H.<sup>5</sup>, Petruželka L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Onkologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

<sup>2</sup> Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. LF UK a VFN v Praze

<sup>3</sup> Oddělení klinické farmakologie a farmacie, VFN v Praze

<sup>4</sup> Farmakologický ústav, 1. LF UK a VFN v Praze

<sup>5</sup> Ústav patologie, 1. LF UK a VFN v Praze

### Souhrn

Data z recentních studií ukazují, že klasifikace imunitního systému (immunoscore) u pacientů s nádorovým onemocněním má v některých případech větší prognostický význam než TNM klasifikace. Délka přežití pacientů s určitou diagnózou se stejnou TNM klasifikační hodnotou může být značně odlišná. Metoda immunoscore kvantifikuje a detekuje jednotlivé typy imunitních buněk v nádorové tkáni pacienta, kde rovněž určuje hustotu jejich infiltrace a jejich lokalizaci. V současné době se v rámci multicentrické mezinárodní spolupráce 23 center ze 17 zemí (včetně našeho pracoviště) hodnotí immunoscore u více než 7 000 pacientů s kolorektálním karcinomem z hlediska nádorového mikroprostředí se zaměřením na prezenci imunitních buněk v nádorové tkáni a v blízkosti nádoru. Výsledky metody immunoscore se dávají do korelace s těmito parametry: 1. odpovědí pacientů na léčbu, 2. mírou progresu, prognózou jejich onemocnění a dalšími imunitními parametry. Ukazuje se, že TNM klasifikace a invazivita tumoru je statisticky závislá na imunitní reakci pacienta (existuje inverzní korelace mezi hustotou infiltrace CD 8<sup>+</sup>, CD 3<sup>+</sup> lymfocyty a rozsahem tumoru). Vysoké hustoty T lymfocytů (CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>) v centru a v invazivním okraji primárního tumoru jsou spojeny s delším obdobím bezpříznakového přežívání, celkového přežívání, nižším rizikem relapsu i menší pravděpodobností vzniku metastáz. Cílem projektu je zavést immunoscore do rutinní diagnostiky.

### Klíčová slova

immunoscore – TNM – VEGF – TGF-β – CD3<sup>+</sup> lymfocyty – CD8<sup>+</sup> lymfocyty

### Summary

Recent studies suggest that immune-classification (immunoscore) in cancer patients has a prognostic value in some cases that seems to be superior to the AJCC/UICC TNM classification. The clinical outcome can vary significantly among patients with a particular diagnosis within the same TNM stage. Immunoscore methodology quantifies and detects different types of immune cells in tumor tissue, and also determines the density of their infiltration and localization at the tumor site. Currently within an international collaboration of 23 centers in 17 countries (including our department), immunoscore is being evaluated in more than 7,000 colorectal cancer patients in terms of the tumor microenvironment, focusing on the presence of immune cells both in the tumor tissue and the tumor invasive margin. Immunoscore results are assessed in correlation with: 1. patient's response to the treatment, 2. rate of progression, disease prognosis and other immune parameters. It appears that the TNM classification and tumor invasiveness is statistically dependent on the immune response of the patient (there is an inverse correlation between the density of the infiltration of CD 8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> lymphocytes and the tumor stage). High densities of T-lymphocytes (CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>) both in the core and the invasive margin of the primary tumor are associated with longer-term asymptomatic survival, overall survival, lower risk of relapse and reduced likelihood of metastases. The project of the international collaboration aims to introduce immunoscore in routine diagnostics.

### Key words

immunoscore – TNM – VEGF – TGF-β – CD3<sup>+</sup> lymphocytes – CD8<sup>+</sup> lymphocytes

Práce byla podpořena AZV ČR 15-28188A, Ligy proti rakovině a PRVOUK-P-27/LF1/1.

This project was supported by AZV CR 15-28188A, the League Against Cancer and PRVOUK-P-27/LF1/1.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Eva Závadová

Onkologická klinika

1. LF UK a VFN

U Nemocnice 2

128 08 Praha

e-mail: EZavadova@seznam.cz

Obdrženo/Submitted: 4. 8. 2015

Přijato/Accepted: 13. 9. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20154S82>

## Úvod

Nádorová onemocnění jsou komplexní a dynamická onemocnění, která jsou charakterizována specifickými rysy. Typickými znaky těchto onemocnění jsou nepřetržitá proliferací signálizace, vyvinutí mechanismů odolávajících buněčné smrti, indukce neoangiogeneze, invazivní růst, zakládání metastatických ložisek, změna energetického metabolismu, inhibice imunitního systému, a tím i omezení následné destrukce nádoru efektorovými buňkami imunitního systému [1,2]. V průběhu vzniku a rozvoje nádorového onemocnění dochází k četným interakcím mezi nádorovými buňkami a imunitním systémem pacienta, ať již lokálně v místě nádorového bujení, nebo vzdáleně cestou různých mediátorů a cytokinů. Nedostatečná imunitní odpověď často koreluje se špatnou prognózou a významně ovlivňuje výsledky léčby [3,4]. Některé tyto deficity či defekty mohou být vrozené, nicméně i nádorové buňky produkují celou řadu faktorů, které suprimují imunitní systém ve snaze uniknout imunitní odpovědi. Mezi nejdůležitější únikové mechanismy patří tvorba imunosupresivních faktorů, produkce neoangiogenetických faktorů a rezistence nádorových buněk k apoptotickým stimulům [5].

## Nové způsoby klasifikace nádorového onemocnění využívající informace z nádorového mikroprostředí

### Popis významu a současného použití TNM klasifikace v managementu kolorektálního karcinomu

Nejrozšířenějším klasifikačním systémem pro posouzení rozsahu nádoru je TNM klasifikace. S větším rozsahem tumoru je vyšší riziko, že nádorové buňky získají schopnost invadovat cévy a zakládat vzdálené metastázy. TNM klasifikace se užívá již více než 80 let a je velmi užitečná v odhadování prognózy u pacientů s různými druhy nádorového onemocnění [6,7]. TNM klasifikace byla po celou tuto dobu upravována a optimalizována. V roce 2009 provedla the Union for International Cancer Control 7. editaci směrnice TNM klasifikace. Precizní, stabilní a mezinárodně schválený

klasifikační systém je esenciální pro globální úspěch v boji s nádorovým onemocněním. Hlavním záměrem by mělo být poskytnutí informace o prognóze onemocnění a na základě této informace i rozhodnutí o individuálním léčebném záměru. V denní praxi a směrnících má TNM klasifikace přímý dopad v rozhodovacím terapeutickém procesu. Změny v TNM klasifikaci by měly značný vliv na péči o onkologické pacienty a volenou terapii, kterou by byli léčeni. Tento klasifikační systém sice úspěšně prověřil čas, ale přesto neposkytuje lékařům kompletní prediktivní hodnotu pro zhodnocení prognózy pacientů. Klinický výsledek léčby se může u pacientů se stejnou TNM klasifikační hodnotou významně lišit [8]. Někteří pacienti mohou v pokročilém stadiu onemocnění setrvat roky se stabilizací nemoci. Oproti tomu se setkáváme se skupinou pacientů stadia I a II, kdy dochází k relapsu a následně rychlé progresi onemocnění [9].

### Přiblížení problematiky nádorového mikroprostředí

Prediktivní přesnost tradiční TNM klasifikace vychází z teorie, že progresi onemocnění je autonomním procesem nádorových buněk. TNM klasifikace se zaměřuje výhradně na nádorové buňky a opomíjí efekt imunitního systému pacienta [10]. Fenotyp tumoru není určen pouze jeho epiteliální komponentou, ale také nádorovým mikroprostředím, které se skládá nejen z vlastních nádorových buněk, ale i z ostatních buněk asociovaných s nádorem. Mezi takové buňky patří především imunitní buňky zánětlivého infiltrátu. Vlivem chemotaktického gradientu nádorového mikroprostředí jsou přitahovány T lymfocyty, dendritické buňky, granulocyty, makrofágy i NK buňky [11]. Zdá se, že nejefektivnější při eradikaci tumoru jsou takzvané CD8 cytotoxické lymfocyty, které jsou schopny nádorovou buňku usmrtit. Význam dalších buněk imunitní reakce není v nádorovém mikroprostředí zcela jasný – nádorové mikroprostředí určované interferony, interleukiny a zvláště chemokiny má klíčový význam pro charakter zánětlivé reakce a funkce imunitních buněk může být v tomto prostředí jiná než v periferní krvi. Pro-

gnostická hodnota TNM klasifikace nebyla nikdy překonána jinými metodami, jako např. imunohistochemií nádorových markerů, průtokovou cytometrií či genetickými vyšetřeními. Ukázalo se však, že analýza specifického typu intratumorální imunitní odpovědi překonala TNM klasifikaci [12,13]. Nádorová progresi nyní musí být považována za výsledek ztráty rovnováhy mezi invazivním nádorovým procesem a obranným systémem pacienta, který se skládá převážně z buněk imunitního systému.

### Metoda immunoscore

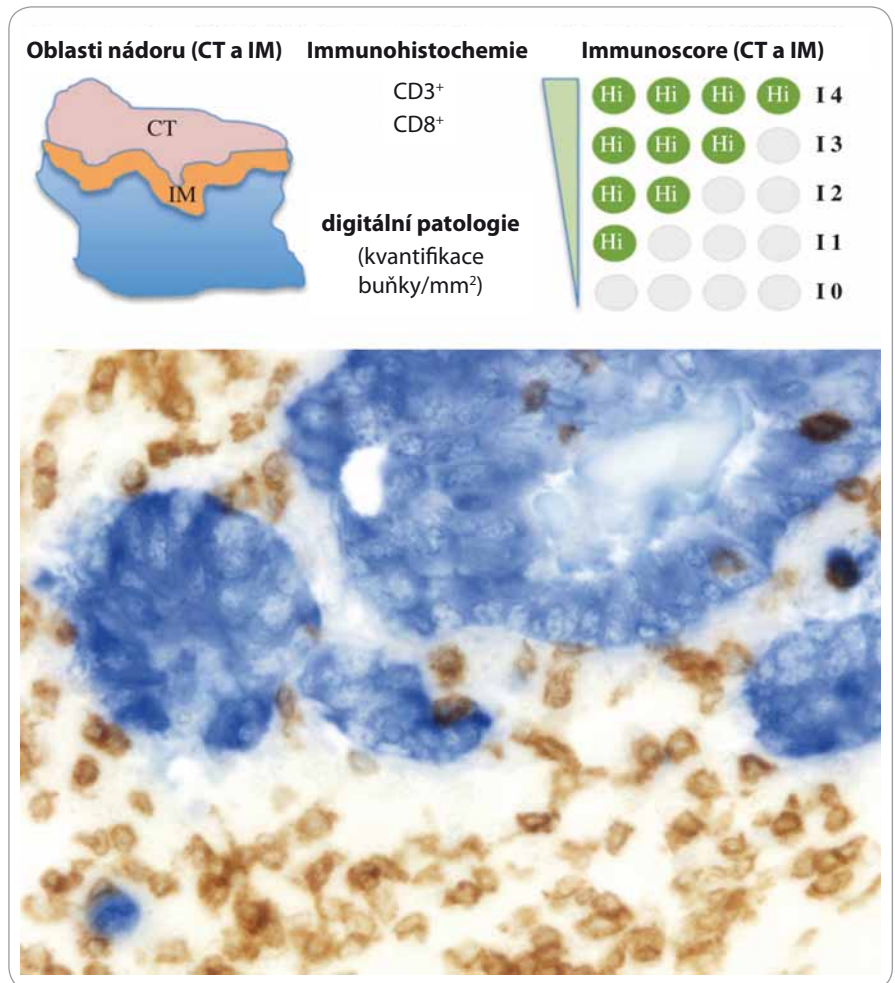
Četná data z rozsáhlých kohort pacientů s kolorektálním karcinomem demonstrovala, že počet, typ a lokalizace imunitních buněk infiltrujících primární nádor má prognostický význam pro celkové bezpříznakové přežití a celkové přežití [12–14]. Imunoklasifikace nádorů byla navržena na základě metody immunoscore. Metoda je pro zpřesnění predikce prognózy a klinického výstupu pacientů prováděna kvantifikací dvou lymfocytárních populací (CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) v centru a invazivním okraji nádorové tkáně. CD3<sup>+</sup> je membránový glykoprotein specifický pro všechny subpopulace T lymfocytů. CD8<sup>+</sup> lymfocyty (efektorové lymfocyty) jsou potom buňky imunitního systému, které jsou schopné za pomoci cytotoxických mechanismů perforiny a granzymy uskutečnit lýzu nádorové buňky. Jedná se o finální článek exekutivního řetězce specifické, protinádorové buněčné imunity. K destrukci nádorové buňky buněčnou imunitou jsou však esenciální antigen prezentující buňky [11].

Immunoscore se pravděpodobně bude týkat i dalších nádorových onemocnění [15,16]. Bylo prokázáno, že přítomnost tumor infiltrujících lymfocytů u pacientek s karcinomem prsu vykazuje u raných stadií Her 2 pozitivních pacientů benefit z léčby trastuzumabem. Mohou sloužit rovněž jako prediktivní marker léčebné odpovědi na neoadjuvantní terapii u triple negativních a Her 2 pozitivních pacientů s karcinomem prsu. Prediktivní efekt tumor infiltrujících lymfocytů byl značný zejména u pacientů léčených karboplatinou [17–19]. Rovněž bylo potvrzeno, že míra infiltrace tumor infiltrujícími lym-

focyty je pozitivním prediktivním faktorem pro léčebnou odpověď na neoadjuvantní terapii u pacientek s karcinomem prsu [15]. U pacientek s karcinomem endometria jsou snížené počty intraepiteliálních CD3<sup>+</sup> tumor infiltrujících lymfocytů spojeny s pokročilým stadiem onemocnění a špatnou prognózou. Počty intraepiteliálních CD3<sup>+</sup> tumor infiltrujících lymfocytů jsou nezávislým prediktorem přežívání pacientek s karcinomem endometria [16].

Data nastřádaná z posledních studií onkologických pacientů ukazují, že klasifikace imunitního systému (immunoscore) má v některých případech větší prognostický význam než TNM klasifikace. TNM klasifikace navíc nepredikuje odpověď pacienta na léčbu (délka přežití pacientů se stejnou TNM klasifikační hodnotou může být značně odlišná). Metoda immunoscore kvantifikuje a detekuje jednotlivé typy imunitních buněk v nádorové tkáni pacienta, kde rovněž určuje hustotu jejich infiltrace a jejich lokalizaci. Ukazuje se, že TNM klasifikace a invazivita tumoru je statisticky závislá na imunitní reakci pacienta (existuje inverzní korelace mezi denzitou CD8<sup>+</sup> a stagingem tumoru). Vysoké koncentrace denzity T lymfocytů (CD8<sup>+</sup>) v centru i invazivním okraji primárního tumoru jsou asociovány s delším obdobím bezpříznakového přežívání, celkového přežívání, nižším rizikem relapsu i menší pravděpodobností vzniku metastáz. Prognostický význam přítomnosti T buněčné populace (CD8<sup>+</sup>) byl potvrzen, a to i při zohlednění stadia, počtu lymfatických uzlin a zavedených molekulárních nádorových biomarkerů, včetně mikrosatelitové instability (MSI), *BRAF* mutací a LINE-1 hypometylací [20,21]. Existuje i asociace mezi mikrosatelitovou instabilitou a infiltrací buňkami imunitního systému [22]. Tumory s přítomnou MSI častěji obsahují intraepiteliální T lymfocyty v reakci na expresi nových antigenů na svém povrchu [23], což pravděpodobně vede k lepší prognóze těchto pacientů.

Immunoscore nabízí hodnocení od 0 (nízká infiltrace buněk imunitního systému v obou oblastech) do 4 (vysoká infiltrace buněk imunitního systému v obou oblastech) (obr. 1). Vyšetření má dvě výhody: 1. zdá se, že immunoscore je silným prognostickým faktorem pře-



**Obr. 1. Definice a metodologie immunoscore (horní část); imunohistochemické barvení CD3<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> buněk ve tkáni kolorektálního karcinomu (dolní část) [1].**

CT – nádorové centrum, IM – invazivní okraj

žívání bez onemocnění a celkové přežití, 2. má biologický význam (reakce adaptivní imunity na přítomnost nádoru) a nabízí se jako nástroj nebo potenciální cíl pro terapii včetně imunoterapie [23–26]. Vzhledem k pravděpodobně shodnému charakteru imunitní kontroly nádorů je znalost stavu imunitního systému jako prognostického faktoru důležitým doplňkem standardní klasifikace [27,28]. Pro posouzení významu immunoscore v klinické praxi a zhodnocení prognostického významu byla zahájena prospektivní multicentrická studie s 600 pacienty léčenými v sedmi francouzských nemocnicích pro kolorektální karcinom léčený primárně chirurgicky. Ve snaze podpořit využití immunoscore v rutinní klinické praxi bylo iniciováno celosvětové konsorcium s podporou Society of Immunotherapy of Cancer [28].

Několik tisíc nádorových vzorků je v současné době analyzováno ve 23 centrech po celém světě. V ČR projekt koordinuje Onkologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze. Byla vybrána dvě nejjednodušší membránová barvení CD3 a CD8 měřená v centru tumoru a v oblasti invazivního lemu. Přesná kvantifikace je v současné době prováděna v rozsahu standardizovaného řezu pomocí jednotného počítačového softwaru (Definiens software).

Cílem tohoto projektu je:

1. prokázat uskutečnitelnost a reprodukovatelnost immunoscore,
2. validovat prognostickou sílu immunoscore u pacientů s kolorektálním karcinomem stadia I–III,
3. demonstrovat užitečnost immunoscore a identifikovat pacienty stadia II s vysokým rizikem rekurence.

Předpokládá se, že tato snaha povede k začlenění immunoscore jako nové součásti klasifikace nádoru doplňující standardní TNM klasifikaci. Výsledky immunoscore by měly lépe odpovídat prognóze pacientů s kolorektálním karcinomem. Měly by lépe identifikovat pacienty s vysokým rizikem rekurence [26] a pomáhat předvídat a stratifikovat pacienty, kteří budou profitovat z adjuvantní terapie [27–29].

## Závěr

Hodnocení množství a typu tumor infiltrujících buněk se zdá být vhodným doplněním standardní TNM klasifikace, a to zejména při rozhodování o adjuvantní terapii. Klinický význam multicentrického projektu Immunoscoring monitorujícího míru infiltrace CD3<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů v centru a v invazivním okraji nádoru bude pravděpodobně brzy potvrzen a začleněn do rutinního použití.

## Literatura

- Galon J, Mlecnik B, Bindea G et al. Towards the introduction of the 'immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 2014; 232(2): 199–209. doi: 10.1002/path.4287.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Matsumura Y, Kobayashi T, Ichiyama K et al. Selective expansion of foxp3-positive regulatory T cells and immunosuppression by suppressors of cytokine signaling 3-deficient dendritic cells. *J Immunol* 2007; 179(4): 2170–2179.
- Bates GJ, Fox SB, Han C et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol* 2006; 24(34): 5373–5380.
- Logan-Collins JM, Lowy AM, Robinson-Smith TM et al. VEGF expression predicts survival in patients with peritoneal surface metastases from mucinous adenocarcinoma of the appendix and colon. *Ann Surg Oncol* 2008; 15(3): 738–744.
- Locker GY, Hamilton S, Harris J et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(33): 5313–5327.
- Weitz J, Koch M, Debus J et al. Colorectal cancer. *Lancet* 2005; 365(9454): 153–165.
- Nagtegaal ID, Quirke P, Schmolli HJ. Has the new TNM classification for colorectal cancer improved care? *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 9(2): 119–123.
- Mlecnik B, Bindea G, Pages F et al. Tumor immunosurveillance in human cancers. *Cancer Metastasis Rev* 2011; 30(1): 5–12. doi: 10.1007/s10555-011-9270-7.
- Bindea G, Mlecnik B, Fridman WH et al. Natural immunity to cancer in humans. *Curr Opin Immunol* 2010; 22(2): 215–222. doi: 10.1016/j.coi.2010.02.006.
- Kopecký J, Slovacek L, Priester P et al. Changes in immune reactivity in cancer patients. *Klin Onkol* 2012; 25(2): 97–102. doi: 10.14735/amko201297.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313(5795): 1960–1964.
- Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol* 2011; 29(6): 610–618. doi: 10.1200/JCO.2010.30.5425.
- Pages F, Berger A, Camus M et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(25): 2654–2666.
- Melichar B, Študentová H, Kalábová H et al. Predictive and prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with breast cancer treated with neoadjuvant systemic therapy. *Anticancer Res* 2014; 34(3): 1115–1125.
- Čermáková P, Melichar B, Tomšová M et al. Prognostic significance of CD3<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes in patients with endometrial carcinoma. *Anticancer Res* 2014; 34(10): 5555–5561.
- Denkert C, Loibl S, Noske A et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(1): 105–113. doi: 10.1200/JCO.2009.23.7370.
- Loi S, Sirtaine N, Piette F et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol* 2013; 31(7): 860–867. doi: 10.1200/JCO.2011.41.0902.
- Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8(3): 151–160. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.223.
- Nosho K, Baba Y, Tanaka N et al. Tumor-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol* 2010; 222(4): 350–366. doi: 10.1002/path.2774.
- Ogino S, Nosho K, Irahara N et al. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res* 2009; 15(20): 6412–6420. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1438.
- Guidoboni M, Gafa R, Viel A et al. Microsatellite instability and high content of activated cytotoxic lymphocytes identify colon cancer patients with a favorable prognosis. *Am J Pathol* 2001; 159(1): 297–304.
- Tougeron D, Fauquembergue E, Rouquette A et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancers with microsatellite instability are correlated with the number and spectrum of frameshift mutations. *Mod Pathol* 2009; 22(9): 1186–1195. doi: 10.1038/modpathol.2009.80.
- Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(26): 2455–2465. doi: 10.1056/NEJMoa1200694.
- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363(8): 711–723. doi: 10.1056/NEJMoa1003466.
- Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(26): 2443–2454. doi: 10.1056/NEJMoa1200690.
- Galon J, Pages F, Marincola FM et al. Cancer classification using the Immunoscoring: a worldwide task force. *J Transl Med* 2012; 10: 205. doi: 10.1186/1479-5876-10-205.
- Galon J, Pages F, Marincola FM et al. The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J Transl Med* 2012; 10: 1. doi: 10.1186/1479-5876-10-1.
- Väyrynen JP, Vornanen JO, Sajanti S et al. An improved image analysis method for cell counting lends credibility to the prognostic significance of T cells in colorectal cancer. *Virchows Arch* 2012; 460(5): 455–465. doi: 10.1007/s00428-012-1232-0.