

Особенности Т-клеточного иммунитета при раке молочной железы

Л.В. Скотаренко, И.К. Воротников, З.Г. Кадагидзе, Ф.А. Шамилов
ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контакты: Лидия Викторовна Скотаренко remrem84@mail.ru

В настоящее время не вызывает сомнений тот факт, что формирование и рост злокачественных новообразований происходят на фоне выраженных нарушений иммунной системы. За последние десятилетия достигнуты большие успехи в исследовании иммунологии и иммунотерапии злокачественных опухолей, в том числе рака молочной железы. Несмотря на активное исследование особенностей клеточного иммунитета при раке молочной железы, многие детали пока остаются недостаточно изученными, а имеющаяся информация — спорной и немногочисленной, что и диктует необходимость дальнейшего изучения этой проблемы.

Ключевые слова: рак молочной железы, противоопухолевый иммунитет, Treg-клетки

The specific features of T cell immunity in breast cancer

L.V. Skotareno, I.K. Vorotnikov, Z.G. Kadagidze, F.A. Shamilov

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The fact that the formation and growth of malignancies occur with pronounced immune impairments is beyond question now. In the past decades, great progress has been made in the studies of the immunology and immunotherapy of malignancies, including breast cancer. Despite intensive studies of the specific features of cell immunity in breast cancer many points remain to be inadequately studied so far and the available information is controversial and scarce, which calls for further studies.

Key words: breast cancer, antitumor immunity, Treg cells

Как известно, главную роль в противоопухолевом иммунитете играет клеточный иммунный ответ, ключевыми участниками которого являются CD8+ -цитотоксические Т-лимфоциты и NK-клетки, оказывающие прямое (в результате апоптоза или путем выделения гранзима В и перфорина) или не прямое (посредством цитокинов) цитотоксическое действие на клетки-мишени [1, 2], а также макрофаги и дендритные клетки.

Огромным вкладом в понимание сложной системы взаимодействия опухоли и иммунитета стало открытие в конце прошлого века целого ряда минорных популяций иммунокомпетентных клеток. Бесспорный интерес представляют CD4+CD25+ -регуляторные Т-лимфоциты (Treg-клетки), играющие важную роль в функционировании иммунной системы. CD4+CD25+ -регуляторные Т-лимфоциты представляют функционально зрелую популяцию регуляторных CD4+ -Т-клеток с высокой постоянной экспрессией маркера CD25+, продуцируемую тимусом и сохраняющую стабильную функцию на периферии [3].

Согласно сложившимся к настоящему времени представлениям, основная функциональная роль Treg-клеток состоит в регуляции толерантности к антигенам нормальных собственных тканей, что обеспечивает защиту организма от развития аутоиммунных и воспалительных процессов [4, 5]. Однако именно такой характер физиологической регуляции, как по-

лагают, и является одной из основных причин возможного стимулирующего влияния Treg-клеток на рост опухоли в результате уклонения ее от влияния иммунной системы, приводящего к развитию так называемой Treg-опосредованной толерантности [6, 7].

В многочисленных исследованиях *in vitro* показано, что популяция натуральных регуляторных Т-клеток, активизированная антигеном, способна подавлять противоопухолевый ответ. Мишенями для супрессорной активности Treg-клетки могут быть CD4+CD25+ и CD8+ -Т-клетки, естественные киллеры, NKT-клетки I типа всех трех субпопуляций, В-клетки, а также дендритные клетки и моноциты [8–12]. Повышение количества Treg в периферической крови, лимфатических узлах и опухоли обнаружено практически при всех злокачественных заболеваниях.

По данным А.М. Wolf et al. [13], в периферической крови онкологических больных, в том числе и при раке молочной железы (РМЖ), число Treg клеток более чем в 2,5 раза превышало их уровень по сравнению со здоровыми людьми ($12,5 \pm 0,9\%$ против $4,7 \pm 0,5\%$, $p < 0,001$).

В аналогичном исследовании [14] была проведена оценка количества CD4+CD25+ -Т-клеток, которые коэкспрессировали маркеры CTLA-4 и CD45R_O и секретировали трансформирующий фактор роста β (TGF- β) и интерлейкин-10 (IL-10), но не продуцировали интерферон γ (IFN γ), у 34 больных РМЖ (рак

in situ — 3, I стадия — 11, II — 10, III — 11 пациенток). Уровень экспрессии данной популяции составил 16,5% по сравнению с 8,6% в группе контроля ($p < 0,001$).

В противоположность этому F. Mozaffari et al. [15] и R. Okita et al. [16] не обнаружили достоверных различий между уровнями Treg-клеток у больных РМЖ и здоровых пациенток.

A. Abo-Elenein et al. [17] изучали динамику уровня CD4+CD25+FOXP3+-клеток в периферической крови при различных стадиях РМЖ. В исследование были включены 10 пациенток с I, 10 — со II и 10 — с III–IV стадиями заболевания, а также 10 здоровых женщин. Доля Treg-клеток была значительно выше у больных РМЖ, чем в группе контроля ($p = 0,001$). Более того, количество Treg-клеток прогрессивно увеличивалось параллельно со стадией заболевания ($p = 0,0649$) и коррелировало с повышением уровня CA15-3 в сыворотке крови ($p = 0,001$). Несмотря на то что, по данным этого исследования, содержание Treg-клеток не является независимым прогностическим фактором, авторы полагают, что определение их уровня в сыворотке крови может быть полезным для идентификации больных с потенциально агрессивным течением заболевания.

Цель исследования U.K. Liyanage et al. [14] состояла в том, чтобы изучить динамику изменения содержания Treg-клеток в периферической крови пациенток с распространенными стадиями РМЖ в процессе проведения системного лечения. Были проанализированы образцы крови до начала терапии и в процессе лечения у 40 Her-2/neu-позитивных и 28 Her-2/neu-негативных больных РМЖ с III и IV стадиями заболевания. В качестве контроля использовали образцы крови 24 здоровых женщин. Частота встречаемости Treg-клеток среди общего числа CD4+-клеток в Her-2/neu-группе не отличалась от таковой в группе контроля ($6,15 \pm 1,36$ и $6,77 \pm 1,29\%$). В ходе проведения химиотерапии (ХТ) изменения содержания Treg-клеток не зарегистрировано. Напротив, у Her-2/neu+-больных наблюдались статистически более высокие уровни Treg-клеток ($8,92 \pm 2,54\%$, $p = 0,0002$). Her-2/neu+-пациентки получали терапию трастузумабом в монорежиме или в комбинации с цитотоксическими препаратами. Оценку динамики Treg-клеток проводили после каждого введения герцептина. У 19 из 20 больных, у которых после 2 или 3 курсов терапии был зафиксирован частичный или полный ответ, отмечалось снижение уровня Treg-клеток ($p = 0,0001$), и только у 10 из 20 пациенток, у которых объективный клинический ответ не был достигнут, наблюдалось уменьшение числа Treg-клеток. Исследователи также установили, что у больных РМЖ, ответивших на системное лечение снижением уровня Treg-клеток, развитию прогрессирования предшествовало его увеличение.

Данные, полученные в ходе этой работы, наглядно демонстрируют, что содержание Treg-клеток может быть использовано как ценный суррогатный маркер для оценки эффективности терапии и раннего предсказания прогрессирования.

К настоящему времени предметом исследования становятся Treg-клетки не только периферической крови, но и инфильтрирующие опухоль. Опубликованы несколько исследований, в которых оценено клиническое значение Treg-клеток в опухолевой ткани молочной железы. Эти данные могут свидетельствовать о перераспределении популяции CD4+CD25+-регуляторных клеток за счет их миграции, направленной в зону опухолевого микроокружения [18], возможно, с целью избегания иммунного ответа. Это происходит главным образом за счет продукции CCL22-хемокинов, к которым Treg-клетки имеют рецепторы [19]. В связи с тем что опухолевые клетки продуцируют высокий уровень TGF- β , необходимый для индукции Treg-клеток *in vitro*, это можно рассматривать как механизм индукции новых CD4+CD25+ Foxp3+-клеток в опухолевом микроокружении [20].

Группой ученых [21] были проанализированы 47 образцов опухоли больных РМЖ с использованием метода проточной цитометрии. В опухолевой ткани преобладали CD8+-лимфоциты ($23,4 \pm 2,1\%$), CD4+-лимфоциты ($12,6 \pm 1,7\%$) и CD56+-естественные киллеры ($6,4 \pm 0,7\%$). В 68,4% случаев CD8+-клетки имели фенотип клеток-эффекторов (в основном, CD8+CD28+), из которых около половины (46%) экспрессировали активационный маркер CD25. В 31,6% наблюдений CD8+-клетки экспрессировали маркеры, характерные для фенотипа супрессорных клеток (CD8+CD28-), 59,6% CD4+-T-лимфоцитов экспрессировали молекулу CD25+. Приблизительно 43,6% CD4+CD25+-клеток коэкспрессировали CD152 и FOXP3, т. е. имели фенотип Treg-клеток.

В данном исследовании авторы не отметили достоверных различий между уровнями Treg-клеток при различных стадиях заболевания. Однако ими была выявлена положительная корреляция между CD4+CD25+-популяцией и возрастом больных РМЖ старше 50 лет ($p = 0,045$). Кроме того, более высокий уровень T-лимфоцитов с фенотипом CD4+CD25- коррелировал с более высокой ядерной экспрессией рецептора эстрогена в клетках опухоли.

В похожем исследовании [22] уровень экспрессии FOXP3+Treg-клеток сопоставили с клинико-патологическими параметрами РМЖ для определения его прогностического значения. При изучении полученных во время операции 68 образцов опухолевой ткани было установлено, что опухоли с высоким содержанием FOXP3+Treg-клеток ассоциируются с ведущими факторами прогноза — большими (> 4 см) размерами ($p = 0,017$), высокой степенью гистологической злока-

чественности ($p < 0,001$), наличием перитуморальной сосудистой инвазии ($p = 0,022$) и отрицательным гормональным статусом ($p = 0,01$).

Большое ретроспективное исследование клинического значения FOXP3+Treg-клеток при РМЖ провели G.J. Bates et al. [23]. Они описали 283 случая первично операбельного РМЖ, по поводу которого больным было проведено хирургическое лечение в объеме радикальной мастэктомии ($n = 70$) или секторальной резекции ($n = 213$) в период с 1986 по 1998 г. В опухолевой ткани, хранившейся в архиве, а также в нормальной ткани молочной железы при помощи мкАТ 236А/Е7 определяли содержание FOXP3+Treg-клеток. Высокий уровень FOXP3+Treg-клеток характеризовался обнаружением ≥ 15 клеток в поле зрения. Установлено, что количество FOXP3+Treg-клеток было значительно выше в опухолевых образцах по сравнению с их числом в нормальной ткани молочной железы. При инвазивном РМЖ наблюдался более высокий уровень FOXP3+Treg-клеток, чем при раке *in situ* ($n = 237$ и $n = 62$ соответственно, $p = 0,001$). Статистический анализ показал, что для случаев РМЖ с высоким содержанием FOXP3+Treg-клеток характерны высокая гистологическая степень злокачественности ($p = 0,001$), вовлечение в опухолевый процесс лимфатических узлов ($p = 0,01$) и отрицательный эстрогеновый статус ($p = 0,001$). В многофакторном анализе уровень FOXP3+Treg-клеток оказался единственным прогностическим фактором, влияющим на выживаемость больных РМЖ. При FOXP3-позитивных случаях рака *in situ* был отмечен более высокий риск развития рецидива ($p = 0,04$) по сравнению с таковым при FOXP3-негативных случаях. Показатели выживаемости у больных РМЖ I–II стадий с высокой экспрессией уровня FOXP3+Treg-клеток в опухолевой ткани были достоверно ниже, чем таковые у пациенток с низким их уровнем. Вероятность достижения 10-летней безрецидивной выживаемости оказалась равной 50% в Treg+-группе и 70% — в Treg--группе ($p = 0,004$). Вероятность пережить 10-летний рубеж составляет 60% при высоких значениях содержания FOXP3+Treg-клеток по сравнению с 75% при стандартно допустимом уровне их в опухоли ($p = 0,007$). Аналогичные показатели выживаемости были зарегистрированы в эстрогенпозитивных группах, различавшихся уровнем экспрессии FOXP3+Treg-клеток. Высокое число FOXP3+Treg-клеток в опухолевой ткани больных с положительным эстрогеновым статусом коррелировало с более короткой общей (75% против 82%, $p = 0,07$) и безрецидивной (43% против 55%, $p = 0,03$) выживаемостью. Авторы считают, что уровень FOXP3+Treg-клеток может служить новым независимым прогностическим фактором для идентификации больных РМЖ с высоким риском прогрессирования. Более того, это может позволить индивидуализировать адью-

вантную гормональную терапию (ГТ) эстрогенпозитивных больных с высоким уровнем FOXP3+Treg-клеток как по длительности, так и в результате изначальной замены тамоксифена на ингибиторы, которые через подавление продукции эстрогена могут сократить количество инфильтрирующих FOXP3+Treg-клеток [24].

E.M. De Kruif et al. [25] опубликовали результаты лечения 677 больных ранними стадиями РМЖ (pT1 — 38%, pT2 — 49%, pT3–4 — 13%, pN0 — 55,1%, pN+ — 43,6%), основным методом лечения которых был хирургический, в зависимости от экспрессии уровня Treg-клеток в опухолевой ткани. Опухоли считались Treg-позитивными при обнаружении ≥ 1 CD4+CD25+FOXP3+-клетки в поле зрения. Адьювантная терапия была проведена 230 пациенткам (ХТ — 112, ГТ — 75, ХТ + ГТ — 18), и 369 пациенток не получали дополнительного лекарственного лечения. В многофакторном анализе было выявлено, что только количество Treg-клеток, а также уровень экспрессии HLA I (>5%) в зоне опухоли при РМЖ определяют эффективность ХТ и прогноз (риск прогрессирования в течение 15 лет составил 68% по сравнению с 30% при отсутствии данных маркеров, $p = 0,013$). Однако эти исследователи высказывают мнение, что полученный эффект достигается именно благодаря предполагаемой селективной элиминации регуляторных Т-клеток под влиянием проводимого лечения, т. е. ХТ может выборочно устранить Treg-клетки, позволяя тем самым цитотоксическим лимфоцитам уничтожать опухолевые клетки, которые сохранили экспрессию молекул HLA I класса.

С учетом сказанного выше хочется еще раз подчеркнуть, что за последние десятилетия были достигнуты большие успехи в исследовании иммунологии и иммунотерапии рака, в том числе РМЖ. Не вызывает сомнений тот факт, что формирование и развитие РМЖ сопровождается возникновением выраженных нарушений в системе иммунитета и усугубляется применяемыми лечебными воздействиями (операция, облучение, ХТ, ГТ). С другой стороны, известно, что степень активности различных звеньев иммунитета определяет разный исход заболеваний — от инфекционных до онкологических, поэтому чем раньше выявлено заболевание, тем больше вероятность получения высоких отдаленных результатов его лечения. Однако, несмотря на существенные достижения в терапии первично-операбельного РМЖ в целом, существует группа больных, результативность лечения которых даже при использовании высокоэффективных алгоритмов терапии остается невысокой. Изучение активности различных субпопуляций Т-лимфоцитов, обеспечивающих эффективность клеточного противоопухолевого иммунитета, может оказаться полезным для прогнозирования клинического течения

РМЖ на ранних стадиях и объяснения неудач лечения отдельных подгрупп пациенток. Исследование путей регуляции иммунного ответа при РМЖ имеет большое значение не только для фундаментального понимания механизмов функционирования иммунорегуляторных клеток, но и для разработки иммунотерапевтических стратегий для лечения этого заболевания с учетом его биологических особенностей как

на начальном этапе, так и в период адъювантной терапии.

Несмотря на активное исследование особенностей клеточного иммунитета при РМЖ, многие детали пока остаются недостаточно изученными, а имеющаяся информация — спорной и немногочисленной, что и диктует необходимость дальнейшего изучения этой проблемы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Seino K., Motohashi S., Fujisawa T. et al. Natural killer T cell-mediated antitumor immune responses and their clinical applications. *Cancer Sci* 2006;97:807–12.
2. Tahir S.M., Cheng O., Shaulov A. et al. Loss of IFN- γ production by invariant NKT cells in advanced cancer. *J Immunol* 2001; 167:4046–50.
3. Itoh M., Takahashi T., Sakaguchi N. et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999;162:5317–26.
4. Fontenot J.D., Rudensky A.Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005;6:331–7.
5. Sakaguchi S. The origin of FOXP3-expressing CD4+ regulatory T cells: thymus or periphery. *J Clin Invest* 2003;112:1310–2.
6. Juang C.M., Hung C.F., Yeh J.Y. Regulatory T cells: potential target in anticancer immunotherapy. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2007;46(3):215–21.
7. Ruter J., Barnett B.G., Kryczek I. et al. Altering regulatory T cell function in cancer immunotherapy: a novel means to boost the efficacy of cancer vaccines. *Front Biosci* 2009;14:1761–70.
8. Azuma T., Takahashi T., Kunisato A. et al. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res* 2003;63:4516–20.
9. Lim H.W., Hillsamer P., Banham A.H. et al. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2005;175:4180–3.
10. Trzonkowski P., Szmit E., Mysliwska J. et al. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol* 2004;112:258–67.
11. Romagnani C., Della Chiesa M., Kohler S. et al. Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells. *Eur J Immunol* 2005;35:2452–8.
12. Chen W. Dendritic cells and (CD4+) CD25+ T regulatory cells: crosstalk between two professionals in immunity versus tolerance. *Front Biosci* 2006;11:1360–70.
13. Wolf A.M., Wolf D., Steurer M. et al. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003;9:606–12.
14. Liyanage U.K., Moore T.T., Joo H.G. et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002; 169:2756–61.
15. Mozaffari F., Lindemalm C., Choudhury A. et al. NK-cell and T-cell functions in patients with breast cancer: effects of surgery and adjuvant chemo- and radiotherapy. *Br J Cancer* 2007;97:105–11.
16. Okita R., Saeki T., Takashima S. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2005;14(5):1269–73.
17. Abo-Elenein A., Elgohary S.E., Hashish A. et al. Significance of immunoregulatory T cells in different stages of breast cancer patients. *Egypt J Immunol* 2008;15(2):145–52.
18. Курганова Е.В., Тихонова М.А., Ласкавая Е.Г. и др. Регуляторные Т-клетки при доброкачественных и злокачественных опухолях яичников. *Иммунология* 2009(6):349–55.
19. Curiel T.J. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 2007;117(5):1167–74.
20. Baecher-Allan C., Anderson D.E. Immune regulation in tumorbearing hosts. *Curr Opin Immunol* 2006;18:214–9.
21. Leong P.P., Mohammad R., Ibrahim N. et al. Phenotyping of lymphocytes expressing regulatory and effector markers in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Immunol Lett* 2006;102(2):229–36.
22. Ghebeh H., Barhoush E., Tulbah A. et al. FOXP3+ Tregs and B7-H1+/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: Implication for immunotherapy. *BMC Cancer* 2008; 8:57–68.
23. Bates G.J., Fox S.B., 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;24:5373–80.
24. Polanczyk M.J., Carson B.D., Subramanian S. et al. Cutting edge: Estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *J Immunol* 2004; 173:2227–30.
25. De Kruijff E.M., Van Nes J.G., Sajat A. et al. The predictive value of HLA class I tumor cell expression and presence of intratumoral Tregs for chemotherapy in patients with early breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16(4):1272–80.