

Dr Roman Krzysiek, MD, PhD.

Streszczenie wykładu: KONTROLA FUNKCJI REGULATORYWYCH KOMÓREK TREGS FOXP3+ JAKO CEL TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Immunoterapia to strategia leczenia przeciwnowotworowego polegająca na aktywacji układu immunologicznego, który posiada wysoko skuteczne mechanizmy obronności przeciwnowotworowej. Rozwój chorób nowotworowych uwarunkowany jest tym, że niektóre komórki nowotworowe wymykają się spod kontroli układu immunologicznego rozrastając się w sposób niekontrolowany. Skutecznie oszukując różne mechanizmy niszczące komórki nowotworowe lub hamujące ich wzrost, guz nowotworowy staje się nierozpoznawalny dla układu odpornościowego uniemożliwiając tym samym jego eliminację.

W ciągu ostatnich kilku lat, immunoterapia oraz tzw. terapie celowane zdominowały współczesne trendy leczenia przeciwnowotworowego. Ocenia się, że w najbliższych latach immunoterapia będzie jedną z najszybciej rozwijających się strategii leczenia w dziedzinie onkologii ze względu na zapowiadane szybkie wprowadzanie do zastosowania w klinice coraz to nowych leków z tej grupy. Podczas corocznej konferencji Amerykańskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej (ASCO) w 2013 roku przedstawiono prognozy, według których immunoterapia zdominuje leczenie chorób nowotworowych w nadchodzących latach, a po 2020 roku może być ona zaproponowana w leczeniu nawet co drugiego nowotworu. Immunoterapia opiera się na całkowitej zmianie obowiązującego w ostatnich kilkudziesięciu latach w onkologii paradygmatu opierającego się na stosowaniu leków lub form leczenia wykazujących udowodnione bezpośrednio działanie toksyczne wobec komórek nowotworowych (leczenie cytostatyczne - chemioterapia oraz radioterapia). Immunoterapia ma zupełnie inny mechanizm działania - leki z tej grupy nie mają udowodnionego bezpośredniego efektu cytotoksycznego na komórki nowotworowe, a działają jedynie pośrednio stymulując naturalne mechanizmy istniejące w układzie odpornościowym, odpowiedzialne za wykrywanie i eliminację komórek nowotworowych. Immunoterapia jest obecnie jedną z nielicznych strategii terapeutycznych w onkologii, która nawet na etapie zaawansowanego lub uogólnionego procesu nowotworowego może doprowadzić do długotrwałych (wieloletnich) przeżyć pacjentów. Czy immunoterapia może potencjalnie doprowadzić do całkowitego wyleczenia chorego z choroby nowotworowej pozostaje jeszcze sprawą otwartą i wymagać będzie oceny w szeroko zakrojonych kontrolowanych badaniach klinicznych.

Prawdziwy przełom w onkologii dotyczący immunoterapii nastąpił kilka lat temu, kiedy wykorzystano w praktyce klinicznej istniejącą wiedzę pochodzącą z wcześniejszych badań doświadczalnych *in vitro*, jak i z badań na mysich modelach nowotworowych. Badania te dotyczyły receptorów błonowych na limfocytach T określanych obecnie jako **punkty kontroli układu immunologicznego („immune checkpoints”)**, tzn. receptorów, które w sposób istotny kontrolują odpowiedź immunologiczną. Receptory te dzieli się na receptory hamujące i stymulujące odpowiedź immunologiczną. Do receptorów hamujących tego typu należą receptory: CTLA-4, PD-1, TIM-3, VISTA, BTLA czy LAG-3. Do receptorów stymulujących zalicza się receptory: GITR, CD27, CD28, CD137, OX40 czy HVEM. Wszystkie te receptory, zarówno o działaniu hamującym jak i stymulującym, są aktywne na różnych etapach odpowiedzi przeciwnowotworowej i kontrolują zarówno czas trwania, jak i nasilenie tej odpowiedzi ze strony limfocytów T CD4+ i T CD8+ oraz innych komórek bardzo istotnych dla odpowiedzi przeciwnowotworowej, jak komórki NK (Natural Killers). Stymulacja receptorów typu *checkpoint* na limfocytach następuje poprzez ich interakcję z naturalnymi ligandami tych receptorów, których ekspresja występuje zarówno na samych

komórkach nowotworowych jak i na innych komórkach naciekających guz. Zaangażowanie receptorów hamujących typu *checkpoint* przez ich ligandy powoduje skuteczne wyłączenie aktywności układu immunologicznego, mechanizmów odpowiedzi przeciwnowotworowej. Istotnym udokumentowanym faktem jest także proces, w którym nowotwory silnie zwiększają ekspresję błonową niektórych receptorów typu *checkpoint*, hamując tym samym odpowiedź przeciwnowotworową. Ze względu na ich rolę w kontroli odpowiedzi immunologicznej, wszystkie wyżej wymienione receptory stanowią aktualnie przedmiot intensywnych badań przedklinicznych oraz klinicznych w wielu jednostkach chorobowych, w tym także w nowotworach złośliwych. Wyżej wymienione grupy receptorów występują na aktywowanych limfocytach T CD4+ oraz limfocytach cytotoksycznych T CD8+, tzw. konwencjonalnych (limfocyty Tconv), które aktywnie uczestniczą w wykrywaniu i niszczeniu komórek nowotworowych *in vivo*. Te same receptory występują jednocześnie na limfocytach zupełnie innego typu i o diametralnie innej funkcji, zwanych komórkami regulatorowymi (**limfocyty Tregs Foxp3+**). Główną rolą fizjologiczną komórek Tregs Foxp3+ jest regulowanie a zwłaszcza hamowanie różnych typów odpowiedzi układu immunologicznego, w tym odpowiedzi przeciwnowotworowej. Uważa się obecnie, że komórki te, występujące tylko w niewielkiej liczbie we krwi obwodowej, pełnią niezwykle ważną rolę w ochronie organizmu przed nadmiernymi reakcjami zapalnymi oraz chorobami z autoagresji. Dowodem na to są ciężkie schorzenia oraz zespoły autoimmunologiczne, jakie obserwuje się w przypadku zmniejszenia liczby czy dysfunkcji tych komórek w organizmie. Z punktu widzenia onkologii, komórki Tregs Foxp3+ naciekające zmianę nowotworową (guz) w sposób skuteczny wyhamowują najważniejsze lokalne i systemowe mechanizmy obrony przeciwnowotworowej, przyczyniając się tym samym do wzrostu i rozsiewu nowotworu.

Najczęściej wykorzystywanym typem immunoterapii przeciwnowotworowej, mającej na celu zablokowanie funkcji receptorów typu *checkpoint* o charakterze hamującym odpowiedź immunologiczną jest stosowanie swoistych przeciwciał monoklonalnych. Pierwszymi receptorami, wobec których otrzymano przeciwciała blokujące były receptory CTLA-4 i PD-1. Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych anty-CTLA-4 (Ipilimumab, Yervoy®) i anty-PD-1 (Nivolumab, Opdivo®) stanowiło prawdziwy przełom w leczeniu chorych z takimi nowotworami jak czerniak złośliwy (melanoma malignum), zwłaszcza w stadium zaawansowanym jego rozwoju. Mechanizm działania obu leków nie jest identyczny. Oba receptory występują zarówno na komórkach Tconv, jak i na komórkach Tregs Foxp3+. Stymulacja receptora CTLA-4 przez naturalne ligandy CD80 i CD86 hamuje indukcję i propagację swoistych wobec nowotworu limfocytów T CD4+ i T CD8+ w obrębie węzłów chłonnych. CTLA-4 działa jak „wyłącznik”, zmniejszając aktywność komórek odpowiadających za bezpośrednie niszczenie komórek nowotworowych i lisę guza, takich jak komórek NK czy limfocytów cytotoksycznych T CD8+. Zahamowanie funkcji tego receptora silnie stymuluje swoistą jak i nieswoistą odpowiedź przeciwnowotworową układu immunologicznego. W przypadku receptora PD-1, jego zaangażowanie przez naturalny ligand PD-L1 (lub PD-L2) uniemożliwia efektywną eliminację komórek nowotworowych poprzez hamowanie funkcji antygenowo swoistych limfocytów T CD4+ czy T CD8+ obecnych w mikrośrodowisku guza. Inhibitory PD-1 (jak i PD-L1/2) znoszą negatywne działanie systemu PD-1/PD-L1/2 wobec odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Jednym z udokumentowanych korzystnych działań tych inhibitorów, zwłaszcza przeciwciał monoklonalnych anty-CTLA-4 jest hamowanie funkcji i eliminacja komórek regulatorowych Tregs Foxp3+ naciekających guz. Pojawiające się na skutek blokady CTLA-4 i PD-1 swoiste wobec guza aktywowane limfocyty T, jak i eliminacja komórek Tregs Foxp3+ powoduje wyjątkowo silne pobudzenie odpowiedzi przeciwnowotworowej doprowadzając w niektórych

przypadkach do spektakularnej całkowitej lizy guza. Ceną za tę odpowiedź są objawy o charakterze autoimmunologicznym. Objawy te wynikają z silnego pobudzenia odpowiedzi immunologicznej z jednoczesnym globalnym obniżeniem funkcji komórek Tregs Foxp3+. W niektórych przypadkach, objawy te wymagają dodatkowej hospitalizacji pacjenta i stanowią najważniejsze działanie niepożądane, związane z leczeniem inhibitorami typu checkpoint. Toksyczność przeciwciał anty-CTLA-4 jest przy tym dużo większa niż przeciwciał anty-PD-1 czy anty-PD-L1. Dotychczas opublikowane wyniki badań z wykorzystaniem przeciwciał anty-CTLA-4, anty-PD-1, anty-PD-L1, czy ich kombinacji u chorych na nowotwory w stadium zaawansowanym są bardzo obiecujące i wskazują, że strategia ta może okazać się skuteczna nie tylko w przypadku nowotworów o znanej immunogenności, jak czerniak, rak nerki, niektóre raki płuc, ale również w przypadku nowotworów o niskiej immunogenności (np. część raków płuc). Bardzo istotnym z punktu widzenia klinicznego faktem jest działanie synergiczne ze znaczącym wydłużeniem całkowitego czasu przeżycia pacjentów, obserwowanym po jednoczesnym zastosowaniu dwóch inhibitorów typu checkpoint (anty-CTLA-4 + anty-PD-1). Powyższe strategie odblokowywania hamulców układu odpornościowego okazały się skuteczne w leczeniu chorób nowotworowych, poza czerniakiem złośliwym, takich jak rak płuca, nerki, pęcherza moczowego, jelita grubego, gruczołu krokowego, piersi oraz nowotwory układu krwiotwórczego. Obserwacja ta, pokazująca, że znacząco lepszy wynik terapeutyczny można uzyskać stosując połączenie różnych form immunoterapii jest bardzo obiecująca i otwiera drogę do testowania coraz to nowych kombinacji już dostępnych leków z nowymi lekami, które pojawią się w przyszłości. Obserwacja ta stanowi także silny impuls do badań podstawowych mających na celu identyfikację nowych celów terapeutycznych, zdolnych do kontrolowania odpowiedzi przeciwnowotworowej. Wg opinii ekspertów, postęp w leczeniu przeciwnowotworowym zależeć będzie od poznania nowych celów dla immunoterapii (immunointerwencji) oraz leczenia kojarzonego z już stosowanymi lekami i strategiami terapeutycznymi.

Wprowadzenie immunoterapii z wykorzystywaniem inhibitorów checkpoint doprowadziło do znaczącej poprawy przeżycia u pacjentów z wieloma typami nowotworów, jednak kilka istotnych problemów związanych z tą formą leczenia pozostaje do rozwiązania: (i) istnieją typy nowotworów, które nie odpowiadają w ogóle lub bardzo słabo na dostępne aktualnie formy immunoterapii, (ii) wciąż niski procent pacjentów uzyskujących długoletnie przeżycia, nawet w przypadku nowotworów odpowiadających na leczenie i przy skojarzonym leczeniu dwoma lekami z tej grupy (np. anty-CTLA-4 + anty-PD-1), (iii) wysoka toksyczność leczenia (zwłaszcza inhibitorów CTLA-4 i leczenia skojarzonego). Odrębną, ale także ważną kwestią pozostaje wciąż ograniczona liczba nowotworów kwalifikowanych do tego typu leczenia oraz bardzo wysoki jego koszt, a więc ograniczona dostępność dla większej liczby pacjentów. Wszystkie te argumenty mocno przemawiają za celowością dalszych poszukiwań nowych celów terapeutycznych do wykorzystania w immunoterapii nowotworów.

Praca naszej grupy badawczej w laboratorium INSERM U996 w Clamart pod Paryżem ze współpracą z Suzhou Institute of System Medicine w Chinach koncentruje się na identyfikacji nowych celów terapeutycznych specyficznych wobec komórek regulatorowych (Tregs Foxp3+) naciekających guzy nowotworowe.

Celem tego projektu jest znalezienie nowych istotnych funkcjonalnie receptorów błonowych lub białek wewnątrzkomórkowych, które w sposób skuteczny eliminowałyby wyjątkowo niekorzystne dla odpowiedzi przeciwnowotworowej komórki Tregs Foxp3+ w obrębie guza. W idealnym scenariuszu, zahamowanie funkcji takich receptorów błonowych lub białek wewnątrzkomórkowych nie powinno mieć większego niekorzystnego efektu na inne

populacje komórek Tregs Foxp3+ w organizmie (warunek niezbędny do wyeliminowania lub przynajmniej znacznego ograniczenia komplikacji typu autoimmunologicznego), jak i na różne populacje komórek efektorowych naciekających guz (komórki nie-Tregs Foxp3+, limfocyty Tconv, komórki NK...), absolutnie niezbędnych do uzyskania skutecznej odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Wykorzystując szeroko obecnie stosowaną technologię mikromacierzy DNA (gene Chip/DNA Microarray), która pozwala na jednoczesne analizowanie ekspresji wszystkich genów komórki (>72 000 transkryptów obejmujących mRNA ale także różne grupy małych regulatorowych RNA) nasz zespół zanalizował ekspresję wszystkich genów komórek Tregs Foxp3+ infiltrujących guzy w mysim modelu włókniakomięsaka (fibrosarcoma), złośliwego nowotworu wywodzącego się z fibroblastów, który charakteryzuje się obfitymi naciekami komórek układu odpornościowego, w tym komórek Tregs Foxp3+. Zestaw genów, których ekspresja charakteryzuje komórki Tregs Foxp3+ naciekające te guzy nowotworowe (transcriptional signature) porównano z ekspresją genów charakteryzującą inne populacje komórek Tregs Foxp3+ (Tregs Foxp3+ wyizolowane z węzłów chłonnych) oraz komórki T CD4+ konwencjonalne (komórki nie-Tregs Foxp3+, limfocyty Tconv CD4+ i CD8+). Głównym celem naszego projektu była identyfikacja genów których ekspresja różni się najbardziej między analizowanymi populacjami komórek, a więc genów kodujących białka mogące reprezentować potencjalne cele terapeutyczne, skierowane w sposób selektywny wobec komórek Tregs Foxp3+, infiltrujących zmiany nowotworowe.

Stosując w/w strategię zidentyfikowany został jeden gen, którego silna ekspresja charakteryzowała komórki Tregs Foxp3+ infiltrujące guz nowotworowy. Gen ten koduje nieselektywny kanał kationowy TRPM4 (Transient receptor potential cation channel subfamily M member 4), znany już, między innymi z kontroli aktywacji limfocytów T. Główną udokumentowaną rolą tego kanału jest negatywna regulacja aktywacji komórek T. W celu analizy roli tego kanału w funkcji komórek T regs Foxp3+ w trakcie odpowiedzi przeciwnowotworowej, stworzyliśmy mysy model, w którym występuje selektywna delecja genu TRPM4 tylko w komórkach Tregs Foxp3+ (model *Trpm4^{fl/fl}Foxp3^{Cre+}*, *Trpm4* cKO). Wykorzystując w/w model, potwierdziliśmy, że selektywna delecja genu TRPM4 w komórkach Tregs Foxp3+ wiąże się ze znacznie zwiększoną kontrolą odpowiedzi przeciwnowotworowej, wynikającą, wg naszej interpretacji, głównie z nasilonej śmierci komórek Tregs Foxp3+ w obrębie guza. Zniszczenie komórek o silnym charakterze immunosupresyjnym, jakim są komórki Tregs Foxp3+, znacznie nasila odpowiedź przeciwnowotworową ze strony swoistych komórek konwencjonalnych (Tconv, CD4+ i T CD8+) i powoduje prawie całkowite zahamowanie jego wzrostu.

W celu określenia roli także innych kanałów jonowych w funkcji komórek Tregs Foxp3+ scharakteryzowaliśmy ekspresję pełnego zestawu wszystkich znanych kanałów jonowych (>450 zidentyfikowanych genów), tzw. specyficznego „*channelome*” tych komórek. Następnym krokiem będzie analiza efektów terapeutycznych in vivo selektywnych blokerów zidentyfikowanych kanałów jonowych, w tym TRPM4, w mysich modelach nowotworowych. Jeśli skuteczność tych blokerów zostanie potwierdzona w modelach mysich, dalszym krokiem będzie zaproponowanie ich zastosowania w ludzkich modelach nowotworów złośliwych, a ostatecznie u pacjentów.

Publikacje:

Yang H, Ma Y, Attout T, Misra N, Hemon P, Dahdah A, Tran T, Bouchet-Delbos L, Berrebi D, Zou W, Fuhlbrigge RC, Taoufik Y, Pallardy M, Bachelier F, Kroemer G, Emilie D, Launay P, Krzysiek R. Targeting TRPM4 ion channel function in Foxp3 Tregs cell unleashes antitumoral immune response in vivo. *eLife*. (Submitted)