

STRESZCZENIE

Wstęp:

Szpiczak plazmocytowy (multiple myeloma, MM) jest nowotworem hematologicznym B-komórkowym charakteryzującym się głębokimi zaburzeniami immunologicznymi postępującymi wraz z progresją choroby. Dlatego poszukiwanie skutecznych leków oddziałujących na elementy tego układu, takich jak inhibitory punktów kontrolnych nadzoru immunologicznego, w celu poprawy immunologicznej odpowiedzi przeciwnowotworowej wydaje się mieć szczególne znaczenie kliniczne. Immunologicznymi punktami kontrolnymi (immune checkpoint, IC) nazywane są cząsteczki, które regulują mechanizmy nadzoru immunologicznego i są zaangażowane w rozwój tolerancji immunologicznej, m.in. badane w niniejszej rozprawie doktorskiej cząsteczki supresorowe PD-1, CTLA-4, BTLA występujące na powierzchni limfocytów T i uczestniczące w procesie hamowania aktywacji tych komórek. Poziom ekspresji tych supresorowych cząsteczek ma zasadnicze znaczenie dla utrzymywania homeostazy układu immunologicznego, tolerancji własnych antygenów tkankowych oraz niszczenia komórek nowotworowych. Zaburzenia ekspresji punktów kontrolnych mogą przyczyniać się do zachwiania równowagi immunologicznej i rozwoju procesów autoimmunizacyjnych (przy obniżonej ekspresji) lub sprzyjać rozwojowi nowotworów (przy zwiększonej ekspresji punktów kontrolnych). Wprowadzenie do terapii przeciwnowotworowej inhibitorów punktów kontrolnych układu immunologicznego (immune checkpoint inhibitor, ICI) poprawiło znacząco wyniki leczenia wielu nowotworów litych oraz chłoniaka Hodgkina, co zachęciło do podjęcia badań klinicznych z użyciem przeciwciał blokujących cząsteczki supresorowe PD-1/PD1-L i CTLA-4 również w innych rozrostach hematologicznych. Przeprowadzone dotąd badania kliniczne z zastosowaniem blokady osi PD-1/PD1-L i/lub CTLA-4 u chorych na MM przyniosło rozczarowanie z powodu niskiego wskaźnika odpowiedzi klinicznych (overall response rate, ORR) przy stosunkowo dużej liczbie poważnych powikłań głównie o charakterze autoimmunizacyjnym. Mechanizmy leżące u podłoża oporności na terapeutyczne inhibitory punktów kontrolnych obserwowanej u przeważającego odsetka pacjentów z MM pozostają nadal niewyjaśnione.

Cel pracy:

Celem niniejszej pracy było zbadanie ekspresji immunologicznych punktów kontrolnych BTLA, PD-1 i CTLA-4 na limfocytach T CD4 krwi obwodowej u chorych na MM w celu określenia znaczenia poszczególnych cząsteczek w rozwoju immunosupresji

systemowej w różnych fazach choroby, a także określenie ich użyteczności klinicznej jako celu terapii z zastosowaniem inhibitorów punktów kontrolnych, oraz zbadanie związku ekspresji PD-1 i CTLA-4 z przebiegiem klinicznym MM celem oznaczenia ich potencjalnej wartości predykcyjnej i/lub rokowniczej.

Material i metody:

Pierwsza praca jest artykułem przeglądowym podsumowującym wiedzę na temat biologii MM, wpływu mikrośrodowiska na rozwój choroby i odpowiedź na leczenie. Na podstawie publikacji naukowych dostępnych w bazach PubMed i Google Scholar przedstawiono zależności elementów komórkowych, macierzy mikrośrodowiska i cytokin obecnych w przestrzeni pozakomórkowej w rozwoju i przerzutowaniu MM.

Kolejne dwie prace oryginalne (powstałe w kontynuacji) prezentują wyniki badań przeprowadzonych w grupie obejmującej 40 pacjentów z aktywnym MM w różnych fazach choroby: 26 pacjentów z nowo rozpoznanym MM (newly diagnosed MM, NDMM) oraz 14 pacjentów z nawrotowym/opornym MM (relapsed/refractory MM, RRMM) uprzednio leczonych chemioterapią, lekami immunomodulującymi (immunomodulatory drugs, IMiD), inhibitorami proteasomu (proteasome inhibitor, PI). Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych ochotników odpowiadających wiekiem i płcią grupie badanej (healthy controls, HC). Badania przeprowadzono po uzyskaniu pisemnej zgody od wszystkich uczestników. Materiał do badań stanowiły komórki jednojądrzaste wyizolowane z krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs). Metodą cytometrii przepływowej oznaczano ekspresję jakościową i ilościową badanych ICs (PD-1, CTLA-4 i BTLA) w populacjach limfocytów T CD4+, CD4+CD127+ (T effector cells, Teff) oraz CD4+CD127- (T regulatory cells, Treg). Stan systemowej aktywacji określano poprzez określenie ekspresji markera aktywacji CD69 w populacji limfocytów T CD4. Ponadto badano populację limfocytów efektorowych: Th1 (CD3+CD8-IFN- γ +) i Th17 (CD3+CD8-IL-17+) oraz subpopulacje limfocytów regulatorowych Treg (CD4+CD25+CD127, CD4+CD25+FOXP3+, CD4+FOXP3+CD127-), a także ich wzajemne proporcje w postaci stosunku Th1/Treg i Th17/Treg w różnych fazach choroby. Przedmiotem badania była także wielkość obwodowej populacji starzejących się autoreaktywnych limfocytów T CD4+CD28-. Dodatkowo korelowano ekspresję białek supresorowych PD-1 i CTLA-4 na limfocytach T CD4 z czynnikami niekorzystnego przebiegu klinicznego, a także z czasem do wystąpienia progresji (time to progression, TTP) i czasem całkowitego przeżycia (overall survival, OS) pacjentów.

Wyniki:

Praca pogładowa podsumowuje dotychczasową wiedzę nt. roli mikrośrodowiska szpiku kostnego w rozwoju i progresji MM podkreślając sieć wzajemnych oddziaływań między elementami komórkowymi (uwzględniając również komórki układu immunologicznego) z elementami macierzy pozakomórkowej, które razem tworzą immunosupresyjne środowisko kreujące warunki do transformacji nowotworowej plazmocytołów. Przenoszenie się plazmocytołów do krwi obwodowej prowadzi do osadzania się komórek nowotworowych poza szpikiem kostnym, a tym samym do progresji choroby.

W drugiej publikacji z cyklu o charakterze oryginalnej pracy badawczej wykazano, że limfocyty T CD4 w NDMM prezentują cechy immunostarzenia (immunosenescence), obejmujące deficyt ilościowy ekspresji immunologicznych punktów kontrolnych PD-1, BTLA i CTLA-4 oraz relatywnie zwiększoną sekrecję cytokin prozapalnych IFN- γ i IL-17. Natomiast progresja MM (RRMM) przebiega z częściowym przywróceniem ekspresji cząsteczek supresorowych uczestniczących w nadzorze immunologicznym, co koresponduje z pogłębieniem dysfunkcji sekrecyjnej IFN- γ i IL-17, i odpowiada fenotypowi komórek wyczerpanych (exhausted). Obserwowano także, że PD-1 jest jedynym receptorem supresorowym występującym na większym odsetku limfocytów T CD4 u wszystkich chorych na MM niezależnie od fazy choroby, którego ekspresja koreluje z niekorzystnym przebiegiem klinicznym i tendencją do skróconego OS.

W kolejnej pracy oryginalnej (będącej kontynuacją poprzedniej), poza potwierdzeniem związku suboptymalnej ekspresji immunologicznych punktów kontrolnych z różnymi etapami choroby (NDMM i RRMM), zaobserwowano także obwodową ekspansję limfocytów T CD4+CD28- u wszystkich pacjentów (największą w grupie NDMM), których fenotyp i funkcjonalna charakterystyka odpowiada autoreaktywnym limfocytom cytotoksycznym (noszącym cechy immunostarzenia). Ciekawą obserwacją było wykazanie związku poziomów ekspresji cząsteczek supresorowych z TTP; niski poziom CTLA-4 w grupie NDMM i wysoka ekspresja PD-1 w grupie RRMM korelują z krótszym TTP.

Wnioski:

Zwiększona dystrybucja PD-1 i związek z niekorzystnym przebiegiem klinicznym wskazuje na nadrzędną rolę PD-1 w sieci supresorowych oddziaływań jako przyczynę zaburzonej odporności komórkowej w MM. Mechanizm immunosupresji w MM w

początkowych etapach choroby wiąże się z nasilonym immunostarzeniem limfocytów T, natomiast w czasie progresji MM jest związany głównie z wyczerpaniem funkcjonalnym tych komórek; jedną z cech różniących oba dysfunkcjonalne stany (tj. immunostarzenie i wyczerpanie) jest różny stopień deficytu poziomu ekspresji immunologicznych punktów kontrolnych PD-1, CTLA-4 i BTLA zależny od etapu choroby; suboptymalna ekspresja punktów kontrolnych w MM może istotnie obniżać skuteczność terapii z użyciem inhibitorów tych cząsteczek i stanowić jeden z mechanizmów oporności na tę formę immunoterapii w tej chorobie. Ponadto ekspansja obwodowa starzejących się limfocytów T CD4+CD28- (o właściwościach autoreaktywnych komórek cytotoksycznych) wraz z obniżonym poziomem ekspresji PD-1 i CTLA-4 obserwowanym u pacjentów z MM (szczególnie w grupie NDMM) może świadczyć o zwiększonym potencjale do rozwoju procesów autoimmunizacyjnych zarówno w przebiegu MM, jak i w czasie immunoterapii z użyciem terapeutycznych inhibitorów punktów kontrolnych. Związek niskiego poziomu ekspresji CTLA-4 z istotnie krótszym TTP w grupie NDMM oraz negatywny wpływ ekspresji PD-1 na przebieg kliniczny, OS i TTP w grupie RRMM wskazuje, że stosowanie inhibitorów badanych punktów kontrolnych jest niekorzystną strategią leczniczą dla chorych z NDMM, natomiast pacjenci w grupie RRMM z progresją choroby stanowią grupę chorych, która może odnieść korzyść kliniczną z tej formy terapii.

ABSTRACT

Introduction:

Multiple myeloma (MM) is a B-cell haematological malignancy characterized by profound and progressing immune alterations. Therefore, the efficacy of drugs targeting the elements of immune environments (such as immune checkpoint inhibitors) in order to improve anti-tumor response is of particular clinical importance. Immune checkpoints (ICs) are molecules that regulate immune surveillance mechanisms and are involved in the development of immune tolerance (e.g. inhibitory PD-1, CTLA-4, and BTLA molecules examined in the current dissertation); they are expressed on the surface of immune cells (including T cells) and involved in inhibition of cell activation. The optimal level of ICs expression is essential for maintaining homeostasis of the immune system including tolerance toward tissue self-antigens and eradication of cancer cells. Alterations in the expression of ICs may contribute to the immune imbalance and the development of autoimmune responses (at reduced ICs expression) or promote the development of cancer (when ICs expression is increased). The introduction of ICs inhibitors (ICIs) into cancer therapy significantly improved the results of treatment of many solid cancers and Hodgkin's lymphoma, what prompted physicians to administration of ICIs into clinical trials in other hematological malignancies. However, the clinical trials conducted so far with the use of antibodies blocking the PD-1/PD1-L axis and CTLA-4 in patients with MM have shown disappointing results due to the unfavorable benefit-to-risk profile with low overall response rate (ORR) and a much higher frequency and severity of immune-related adverse events (iRAEs). The mechanisms underlying the resistance to ICIs observed in the vast majority of MM patients remain still unresolved.

The aim of the study:

The purpose of this study was to assess the expression of ICs (BTLA, PD-1 and CTLA-4) on CD4 T lymphocytes in order to determine the involvement of particular receptors in the development of systemic immunosuppression in MM patients at different stages of the disease (at the time of diagnosis and during progression), determination of their usefulness as a target of therapy with ICIs, as well as examination of their relationship with the clinical course of MM in order to determine their potential predictive and prognostic significance.

Material and methods:

The first paper is a review article summarizing the knowledge on the biology of MM, the influence of the microenvironment on both the development of the disease and response to treatment. On the basis of scientific publications available in the PubMed and Google Scholar databases, the relationships between cellular elements, microenvironmental matrix and cytokines present in the extracellular space in the development and metastasis of MM have been shown.

The next two original papers demonstrate the results of research conducted (as a consistent continuation) in a study group of 40 patients with active MM in the different clinical stages of the disease: 26 patients with newly diagnosed MM (NDMM) and 14 patients with relapsed/refractory MM (relapsed/refractory MM, RRMM) previously treated with chemotherapy, immunomodulatory drugs (IMiDs), proteasome inhibitors (PIs). The control population comprised 20 healthy volunteers matched for age and sex (HC). The study was conducted after obtaining written consent from all participants. The study material consisted of mononuclear cells isolated from peripheral blood (PBMCs). The qualitative and quantitative expression of the examined ICs (PD-1, CTLA-4 and BTLA) in the populations of CD4+, CD4+CD127+ (Teff) and CD4+CD127- (Treg) lymphocytes was determined by flow cytometry. Systemic activation status was tested by determining the expression of CD69 activation marker in the CD4 T cell population. In addition, the population of effector lymphocytes: Th1 (CD3+CD8-IFN- γ +) and Th17 (CD3+CD8-IL-17+) and subpopulations of Treg regulatory lymphocytes (CD4+CD25+CD127), CD4+CD25+FOXP3+, CD4+FOXP3+CD127-), as well as the relationship between them (Th1/Treg and Th17/Treg) in different phases of the disease were examined as well. Peripheral expansion of senescent autoreactive CD4+CD28- cells was also studied in all subjects. In addition, the expression of PD 1 and CTLA-4 molecules on CD4 T cells was correlated with clinic and laboratory indices of adverse clinical course, as well as with time to progression (TTP) and patient overall survival (OS).

Results:

The review paper summarized the current knowledge on the role of the bone marrow microenvironment in the development and progression of MM, emphasizing the network of interactions between cellular elements (including immune cells) with elements of the extracellular matrix, which together create an immunosuppressive environment creating conditions for malignant transformation of plasma cells. The transfer of plasma cells to the peripheral blood leads to the deposition of tumor cells outside the bone marrow, and thus to the progression of the disease.

The second study demonstrated that CD4 T cells in NDMM displayed features of immunosenescence (i.e. quantitative deficit of IC expression and relatively increased secretion of pro-inflammatory IFN- γ and IL-17 cytokines), while MM progression is accompanied by a reversion of ICs expression, which corresponds to pronounced IFN- γ and IL-17 secretory dysfunction, consistently with an exhausted phenotype. It was also observed that PD-1 is the only IC expressed on a higher percentage of CD4 T cells in all MM patients, regardless of the stage of the disease, and its expression correlates with an unfavorable clinical course and a tendency to shorten OS.

In the next study (which is a continuation of the previous one), apart from confirming the relationship between suboptimal expression of ICs and different stages of the disease (NDMM and RRMM), expansion of CD4+CD28- cells was also observed in all patients (more pronounced in the NDMM group), whose phenotype and functional characteristics correspond to autoreactive lymphocytes (exerting features of immunosenescence). An interesting observation was also the relationship between ICs expression levels and TTP; low CTLA-4 levels in the NDMM group and high expression of PD-1 in the RRMM group correlate with shorter TTP.

Conclusions:

The increased distribution of PD-1 in the T cell compartment and its association with the unfavorable clinical course of MM may indicate the superior role of PD-1 in the network of suppressor interactions as the cause of impaired cellular immunity in MM. The mechanism of immunosuppression in MM in the early stages of the disease (NDMM) is associated with increased immunosenescence of lymphocytes, while during MM progression (RRMM) it is

mainly associated with functional exhaustion of T lymphocytes; one of the features differentiating the two dysfunctional states (namely immunosenescence and exhaustion) is varying degrees of the suboptimal expression level of ICs depending on the stage of the disease, which may significantly reduce the effectiveness of ICIs therapy and constitute one of the mechanisms of resistance to this form of immunotherapy in MM. Peripheral expansion of senescent CD4⁺CD28⁻ lymphocytes (with autoreactive cytotoxic properties) observed in patients with MM (especially in the NDMM group) may indicate an increased potential for the development of autoimmune responses both in the course of MM and during immunotherapy with ICIs. The relationship of the low CTLA-4 expression with significantly shorter TTP in the NDMM group and the negative impact of PD-1 expression on the clinical course, OS and TTP in the RRMM group indicate that ICI therapy is an unfavorable treatment strategy for patients with NDMM, while in RRMM patients with disease progression this form of therapy could be beneficial.