

УДК 616.34-006.6-074:612.017.1

ФАКТОРЫ ИММУНОСУПРЕССИИ PD-1, PD-L1, IDO1 И КОЛОРЕКТАЛЬНЫЙ РАК

© 2021 г. О. В. Ковалева^{1,*}, М. А. Рашидова¹, А. Н. Грачев¹, В. В. Масленников¹, И. В. Булычева¹, Е. С. Герштейн¹, Е. А. Короткова¹, Н. Ю. Соколов¹, З. З. Мамедли¹, академик РАН Н. Е. Кушлинский¹

Поступило 05.10.2020 г.
После доработки 16.10.2020 г.
Принято к публикации 17.10.2020 г.

В связи с низкой эффективностью иммунотерапии колоректального рака (КРР) крайне перспективным и актуальным является изучение механизмов иммуносупрессии. В данной работе впервые проведено комплексное исследование экспрессии растворимых и тканевых форм PD-1 и PD-L1 в сыворотке крови и опухолях больных КРР, а также IDO1 в опухолях. Определена диагностическая и прогностическая значимость исследованных показателей. Выявлены статистически значимое снижение содержания растворимых форм PD-1 и PD-L1 в сыворотке крови и ассоциация количества PD-L1+ клеток в строме опухолей со стадией КРР. Показано отсутствие корреляций между растворимыми и тканевыми формами исследуемых белков, указывающее на наличие независимых механизмов иммуносупрессии при КРР, что может объяснять неэффективность иммунотерапии данного типа опухолей.

Ключевые слова: колоректальный рак, сыворотка крови, экспрессия, PD-1, PD-L1, IDO1

DOI: 10.31857/S2686738921020153

Важной особенностью развития злокачественной опухоли считают ее уход от иммунологического надзора, что способствует его прогрессированию заболевания. Опухолевые клетки и инфильтрирующие иммунные клетки продуцируют факторы, которые модифицируют микроокружение, придавая ему иммуносупрессивный фенотип. Одними из основных факторов, опосредующих иммуносупрессию, являются PD-1, PD-L1 и IDO1. PD-1 – мембранный рецептор I типа, принадлежащий к семейству CD28/CTLA-4 регуляторов Т-клеток и экспрессирующийся на их поверхности. PD-L1 (B7-H1, CD274) [1] и PD-L2 (B7-DC, CD273) [2] – основные лиганды рецептора PD-1. Активация ключевой точки PD-1/PD-L1 стимулирует апоптоз антиген-специфичных Т-лимфоцитов и подавляет апоптоз регуляторных супрессорных Т-клеток, что является одним из механизмов иммуносупрессии опухоли [3]. IDO1 (indoleamine-2,3-dioxygenase) – фермент, активация которого приводит к деградации L-триптофана (Trp) с образованием N-формилкинуренина [4], а далее целого ряда продуктов, что спо-

Таблица 1. Клинико-морфологические характеристики больных КРР

Характеристика	Всего
Возраст	
≤60	30 (35%)
>60	55 (65%)
Пол	
мужской	46 (54%)
женский	39 (46%)
Стадия	
I–II	57 (67%)
III–IV	28 (33%)
T – размер опухоли	
T1-2	27 (32%)
T3-4	58 (42%)
N – регионарные метастазы	
N–	62 (73%)
N+	23 (27%)
M – отдаленные метастазы	
M–	73 (86%)
M+	12 (14%)
Дифференцировка опухоли	
G1	21 (25%)
G2/3	64 (75%)
Локализация опухоли	
прямая кишка	31 (36%)
слепая и ободочная кишка	54 (64%)

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

*e-mail: ovkovaleva@gmail.com

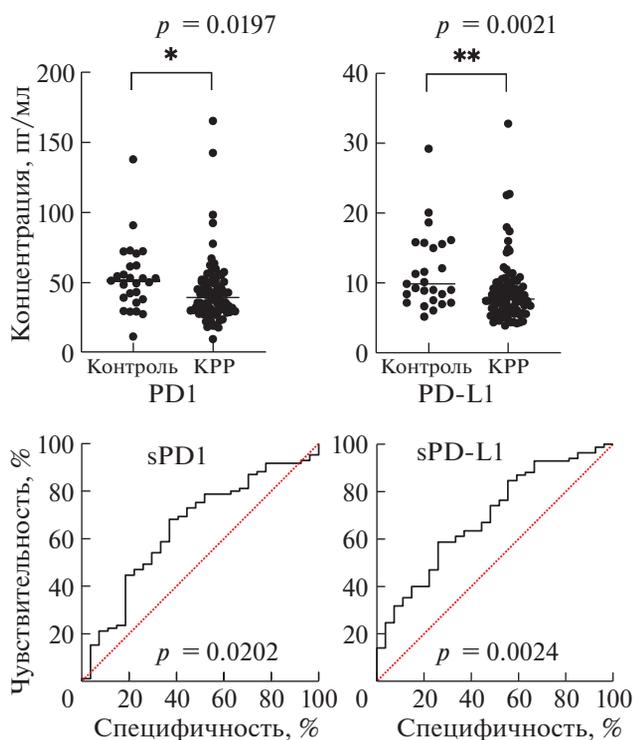


Рис. 1. 1) Сравнительный анализ уровня экспрессии sPD-1 и sPD-L1 у больных КРП и здоровых доноров. 2) ROC-анализ для sPD-1 и sPD-L1 у больных КРП: площадь под ROC-кривой составляет 0.694 (69%) для sPD-L1 и 0.649 (64%) для sPD-1.

способствует гибели эффекторных Т-клеток и привлечению Т-клеток регуляторного фенотипа [5, 6].

Целью данной работы было проведение комплексного исследования содержания растворимых

форм PD-1, PD-L1 (sPD-1, sPD-L1) в сыворотке крови и уровня их экспрессии в опухоли, а также экспрессии IDO1 в опухолях больных колоректальным раком (КРП), с последующим анализом их ассоциации с клинико-морфологическими характеристиками заболевания и корреляционных связей между указанными маркерами.

В исследование включили 85 первичных больных КРП и 27 здоровых доноров, составивших группу контроля, проходивших обследование и лечение в ФГБУ “НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием больных и здоровых людей, соответствуют этическим стандартам этического комитета организации и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участника получено информированное добровольное согласие. Клинический диагноз у всех пациентов подтвержден данными морфологического исследования опухоли согласно Международной гистологической классификации опухолей пищеварительной системы (ВОЗ, 2019), у всех пациентов выявлена аденокарцинома толстой кишки. Характеристика исследуемой выборки больных КРП представлена в табл. 1.

Концентрацию sPD-L1 и sPD-1 определяли в сыворотке крови методом прямого иммуноферментного анализа Human PD-L1 Platinum ELISA и Human PD-1 ELISA kit (Affimetrix, eBioscience, США). Разделение на группы с низким и высоким содержанием sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови проводили относительного их средних значений. Оценку уровня экспрессии PD-L1 и IDO1 в опухолях проводили методом иммуногистохи-

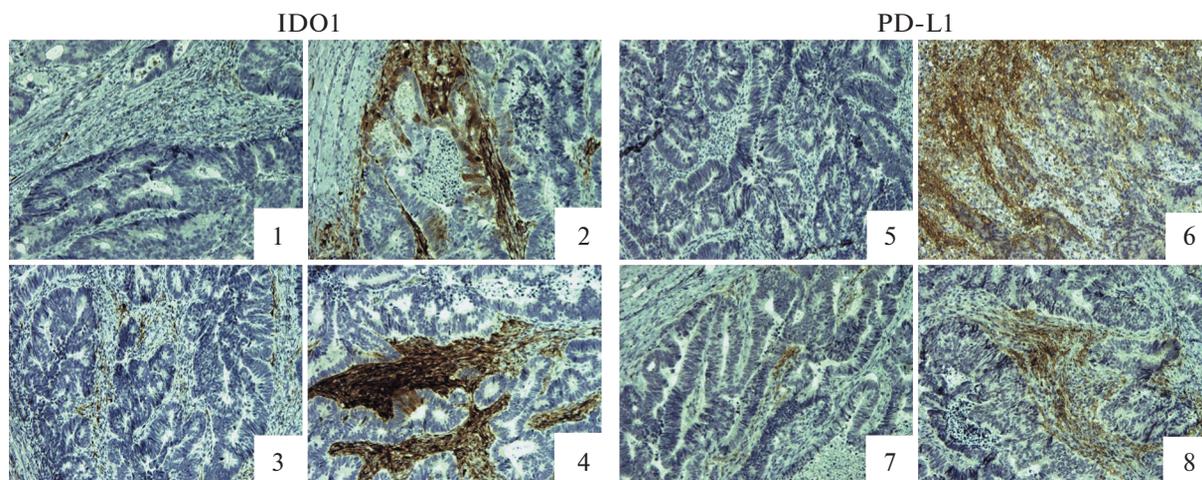


Рис. 2. Экспрессия IDO1 и PD-L1 при КРП. Отсутствие экспрессии IDO1 (1) в опухолевых клетках и PD-L1 (5) в опухолевых и стромальных клетках. Экспрессия IDO1 (2) и PD-L1 (6) в опухолевых и стромальных клетках. Низкое содержание IDO1+ (3) и PD-L1+ (7) клеток в строме опухоли. Высокое содержание IDO1+ (4) и PD-L1+ (8) клеток в строме опухоли.

мии (ИГХ) по стандартной методике с использованием антител к PD-L1 (клон 4E12; Р-Фарм, Россия) и IDO1 (клон D5J4E, Cell Signaling Technology, USA). Для IDO1 и PD-L1 оценивали экспрессию в опухолевых клетках и строме. В зависимости от экспрессии IDO1 и PD-L1 в опухолевых клетках образцы разделены на 2 группы: с наличием и отсутствием экспрессии.

При оценке стромы образцы опухолей разделили на 3 группы с учетом количества PD-L1+ клеток: 0 – отсутствие PD-L1+ клеток, 1 – низкое содержание PD-L1+ клеток, 2 – высокое содержание PD-L1+ клеток. По экспрессии IDO1 в строме опухоли образцы разделили на 2 группы: 1 – отсутствие или низкое содержание IDO1+ клеток; 2 – высокое содержание IDO1+ клеток (рис. 2).

sPD-1 и sPD-L1 при KPP. Анализ результатов исследования показал, что среднее содержание sPD-1 в сыворотке крови здоровых доноров составило 53.07 ± 24.23 пг/мл (11.37–137.8), в группе пациентов с аденокарциномой толстой кишки 47.99 ± 39.32 пг/мл (9.51–287.0). Среднее содержание sPD-L1 в сыворотке крови здоровых доноров составило 13.25 ± 10.17 пг/мл (5.19–56.6), в группе пациентов с аденокарциномой 8.82 ± 4.52 пг/мл (3.19–32.81). Результаты представлены на рис. 1.

Проведенный анализ показал, что у больных KPP наблюдается статистически значимое снижение содержания sPD-1 и sPD-L1 ($p = 0.0021$ и $p = 0.0197$ соответственно) в сыворотке крови по сравнению с контролем. Для оценки диагностической значимости снижения уровня содержания PD-1 и PD-L1 в сыворотке крови в качестве маркера KPP проведен ROC анализ. Площадь под ROC-кривой, равная 0.694 для PD-1 и 0.649 для PD-L1, свидетельствует о среднем качестве модели, что не позволяет использовать полученные данные для диагностических целей.

Уровни sPD-1, sPD-L1 и клинко-морфологические характеристики KPP. Провели анализ уровней sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови больных KPP в зависимости от основных клинко-морфологических характеристик заболевания, результаты представлены в табл. 2.

Выявили, что содержание в сыворотке крови рецептора sPD-1 связано с возрастом, у пациентов в возрасте ≤ 60 лет уровень маркера ниже по сравнению со старшей возрастной группой (> 60 лет). Необходимо отметить, что концентрация sPD-1 и sPD-L1 ассоциирована с наличием метастазов в регионарных лимфоузлах. В группе пациентов с регионарными метастазами KPP наблюдали более высокое содержание исследуемых маркеров по сравнению с пациентами без распространения опухолевого процесса в лимфоузлах.

Экспрессия PD-L1 и IDO1 при KPP. Методом ИГХ провели анализ экспрессии PD-L1 и IDO1 в

Таблица 2. Ассоциация содержания sPD1 и sPD-L1 с клинко-морфологическими характеристиками KPP

	sPD-1 (пг/мл)		p	sPD-L1 (пг/мл)		p
	низкий	высокий		низкий	высокий	
Возраст						0.49
≤60	23	7	<0.05	20	10	
>60	20	35		32	23	
Пол						0.19
мужской	33	13	0.49	25	21	
женский	25	14		27	12	
Стадия						0.23
I–II	42	15	0.14	39	18	
III–IV	16	12		15	13	
Размер опухоли						>0.99
T1-T2	17	10	0.62	17	10	
T3-T4	41	17		35	23	
N – регионарные метастазы						<0.05
N0	46	16	<0.05	40	22	
N+	9	14		9	14	
M – метастазы						0.20
M0	49	24	0.74	47	26	
M+	9	3		5	7	
Дифференцировка опухоли						0.31
G1	14	7	0.79	15	6	
G2/3	48	21		37	27	
Локализация опухоли						0.65
прямая кишка	23	8	0.47	20	11	
слепая и ободочная кишка	35	19		32	22	

опухолях больных KPP. Обнаружено, что в опухолевых клетках PD-L1 экспрессируется в 26% случаев (22 из 85), а IDO1 в 36% (31 из 85). В строме опухолей IDO1 обнаружен в большинстве образцов, однако сильную инфильтрацию IDO1+ клетками стромы наблюдали в 34% случаев (29 из 85). Для PD-L1 результаты отличались. А именно, 35% образцов (30 из 85) не содержали PD-L1+ клеток в опухолевой строме. В остальных исследованных образцах отмечено наличие PD-L1+ клеток в строме: 35% образцов (30 из 85) составили группу с низкой инфильтрацией и 29% образцов (25 из 85) составили группу с высокой инфильтрацией (рис. 2).

Таблица 3. Ассоциация уровня экспрессии PD-L1 и IDO1 в опухоли с клинико-морфологическими характеристиками КРР

	PD-L1 (опухоль)			PD-L1 (строма)			IDO1 (опухоль)			IDO1 (строма)		
	низкий	высокий	<i>p</i>	низкий	высокий	<i>p</i>	низкий	высокий	<i>p</i>	низкий	высокий	<i>p</i>
Возраст												
≤60	24	6	0.44	12	18	0.63	21	9	0.480	22	8	0.34
>60	39	16		18	37		33	22		34	21	
Пол												
мужской	34	12	>0.99	16	30	>0.99	28	18	0.654	30	16	>0.99
женский	29	10		14	25		26	13		26	13	
Стадия												
I–II	41	16	0.60	16	41	<0.05	33	24	0.154	36	21	0.48
III–IV	22	6		14	14		21	7		20	8	
Размер опухоли												
T1-T2	8	19	0.60	8	19	0.63	15	12	0.34	19	8	0.63
T3-T4	14	44		22	36		39	19		37	21	
N												
N0	44	18	0.40	19	43	0.20	36	26	0.13	39	23	0.44
N+	19	4		11	12		18	5		17	6	
M												
M0	55	18	0.49	23	50	0.10	45	28	0.52	46	27	0.21
M+	8	4		7	5		9	3		10	2	
Дифференцировка опухоли												
G1	15	6	0.78	19	43	0.20	15	6	0.44	14	7	>0.99
G2/3	48	16		11	12		39	25		42	22	
Локализация опухоли												
прямая кишка	23	8	>0.99	10	21	0.81	19	12	0.82	22	9	0.49
слепая и ободочная кишка	40	14		20	34		35	19		34	20	

Далее провели анализ ассоциации уровней экспрессии PD-L1 и IDO1 в опухолях с клинико-морфологическими характеристиками КРР. Результаты представлены в табл. 3.

Нами выявлено, что только содержание PD-L1+ клеток в строме опухолей ассоциировано со стадией КРР. На начальных I-II стадиях заболевания чаще наблюдали высокую инфильтрацию стромы опухоли PD-L1+ клетками по сравнению с поздними III-IV стадиями.

Корреляционные связи между растворимыми и тканевыми формами PD1, PD-L1 и IDO1. Провели корреляционный анализ экспрессии исследуемых белков с помощью определения коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Результаты представлены на рис. 3.

Показано, что растворимые формы исследуемых белков (sPD-1 и sPD-L1) статистически значимо коррелировали между собой ($r = 0.34; p = 0.001$). Также была выявлена корреляционная связь между экспрессией IDO1 в опухолевых клетках и

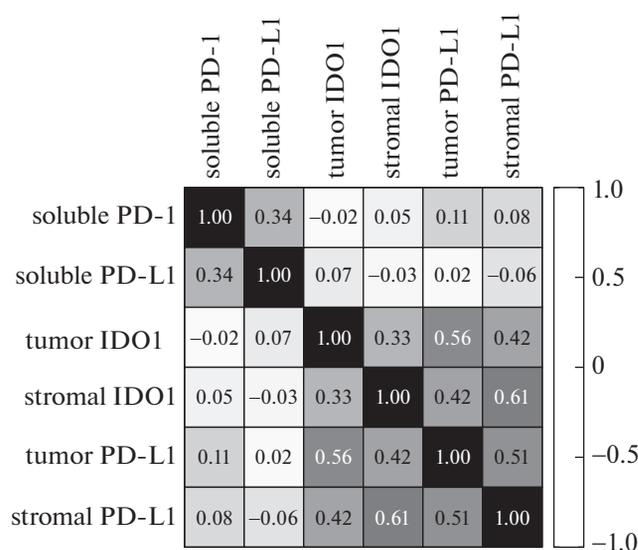


Рис. 3. Корреляционный анализ между экспрессией растворимых и тканевых форм PD-1, PD-L1 и IDO1 (коэффициент корреляции Спирмена).

клетках стромы ($r = 0.33$; $p = 0.002$) и PD-L1 в опухолевых клетках и строме (0.51 ; $p < 0.001$).

Кроме того, обнаружена корреляционная зависимость между количеством PD-L1 и IDO1 в опухолевых клетках ($r = 0.56$; $p < 0.001$) и в строме ($r = 0.61$; $p < 0.001$). Статистически значимых корреляционных зависимостей между концентрациями sPD-1, sPD-L1 в сыворотке крови больных КРР и уровнями экспрессии этих маркеров в первичной опухоли не было выявлено. Полученные данные указывают на необходимость дополнительных исследований с целью подтверждения возможности использования исследованных маркеров для диагностических целей.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований, проект 20-015-00479.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J., et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity // *Annu Rev Immunol.* 2008. V. 26. P. 677–704.
2. Latchman Y., Wood C.R., Chernova T., et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation // *Nat Immunol.* 2001. V. 2. № 3. P. 261–8.
3. Sun C., Mezzadra R., Schumacher T.N. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint // *Immunity.* 2018. V. 48. № 3. P. 434–452.
4. Platten M., Wick W., Van den Eynde B.J. Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion // *Cancer Res.* 2012. V. 72. № 21. P. 5435–40.
5. Wang R., Green D.R. Metabolic reprogramming and metabolic dependency in T cells // *Immunol Rev.* 2012. V. 249. № 1. P. 14–26.
6. Zhai L., Ladomersky E., Lenzen A. et al. IDO1 in cancer: a Gemini of immune checkpoints // *Cell Mol Immunol.* 2018. V. 15. № 5. P. 447–457.

IMMUNOSUPPRESSION FACTORS PD-1, PD-L1, IDO1 AND COLORECTAL CANCER

O. V. Kovaleva^{a, #}, M. A. Rashidova^a, A. N. Gratchev^a, V. V. Maslennikov^a, I. V. Boulitcheva^a, E. S. Gershtein^a, E. A. Korotkova^a, N. Yu. Sokolov^a, V. V. Delektorskaya^a, Z. Z. Mamedli^a, and Academician of the RAS N. E. Kushlinskii^a

^a N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russian Federation
[#]e-mail: ovkovaleva@gmail.com

Due to the low efficiency of immunotherapy for colorectal cancer (CRC), it is extremely promising and relevant to study the mechanisms of immunosuppression. In this work, for the first time, a comprehensive study of the expression of soluble and tissue forms of PD-1 and PD-L1 in blood serum and tumors of patients with CRC, as well as IDO1 in tumors has been carried out. The diagnostic and prognostic significance of the studied parameters was determined. A statistically significant decrease in the number of soluble forms of PD-1 and PD-L1 in the blood serum and an association of the number of PD-L1+ cells in the stroma of tumors with the CRC stage were established. The absence of correlations between soluble and tissue forms of the studied proteins was shown, indicating the presence of independent mechanisms of immunosuppression in CRC, which may explain the ineffectiveness of immunotherapy for this type of tumor.

Keywords: colorectal cancer, blood serum, expression, PD-1, PD-L1, IDO1