

Pro gradu -tutkielma

Anti-PD-1 immunoterapiavasteen ennustaminen kiinteän kudoksen kasvaimissa

Emmi Lindroos



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologia

30.10.2018

Emmi Lindroos Anti-PD-1 immunoterapiavasteen ennustaminen kiinteän
 kudoksen kasvaimissa
Pro gradu -tutkielma: 27 s., 1 liite (1 s.)
Työn ohjaajat: LT Juha Kononen ja FT Nina Rintanen
Tarkastajat: LT Jan Böhm ja FT Jatta Saarenheimo
Lokakuu 2018

Hakusanat: biomarkkeri, PD-L1, PD-1, prediktiivinen, T-lymfosyytti

Immunologisilla syöpähoidoilla voidaan saada erinomaisia hoitotuloksia eri kasvaintaudeissa, mutta vain osalla potilaista. Jotta voidaan ennustaa, hyötyykö potilas immunologisista hoidoista, on hänen kasvaimensa ja immuunijärjestelmänsä ominaispiirteet otettava huomioon. Tässä tutkimuksessa kartoitettiin useiden kiinteän kudoksen kasvainten immunologista tilaa ja etsittiin anti-PD-1 immunoterapiavasteelle prediktiivisiä tekijöitä. Anti-PD-1 immunoterapialla pyritään palauttamaan kasvaimenvastainen immuunivaste estämällä CD8+T-lymfosyyttien pinnalla olevan inhibitorisen PD-1 (programmed death-1) -reseptorin ja siihen sitoutuvan ja useissa kasvaimissa ekspressoituvan PD-1 ligandi 1:n (PD-L1) välinen vuorovaikutus. Tutkimuksen aineistona oli 18 Keski-Suomen keskussairaalassa anti-PD-1 immunoterapialla hoidetun potilaan hoitoa edeltävät kasvainnäytteet, joiden CD3+ ja CD8+T-lymfosyyttien lukumäärä sekä PD-1 ja PD-L1 ekspressio tutkittiin immunohistokemian ja digitaalisen patologian avulla. Kaikissa näytteissä nähtiin kasvainalueella CD3+ ja CD8+T-lymfosyytti-infiltraatio. PD-L1-negatiivisia kasvainnäytteitä oli seitsemän, kuuden PD-L1-positiivisuus oli välillä 1–50 % ja viiden yli 50 %. Kun verrattiin PD-L1-positiivisia PD-L1-negatiivisiin näytteisiin, nähtiin että PD-1-positiivisia lymfositteja sekä kasvaimen reuna-alueen CD8-positiivisia lymfositteja oli enemmän PD-L1-positiivisissa kuin negatiivisissa näytteissä. Kuten aiempien tutkimusten perusteella oli oletettavissa, hyvä hoitovaste oli yleisempi niillä potilailla, joiden näytteet olivat sekä lymfositteirikkaita että PD-L1-positiivisia viitaten adaptiiviseen immuuniresistenssiin kasvaimessa. Kasvaimen ja immuunijärjestelmän välinen vuorovaikutus on kuitenkin monimutkaista ja tässäkin tutkimuksessa nähtiin etteivät kasvaimen lymfositte-infiltraation määrä, lymfositteien PD-1-positiivisuus tai kasvainsolujen PD-L1-positiivisuus yksittäisinä tekijöinä tai yhdistelmänä kykene riittävän hyvin erottamaan huonon ja hyvän hoitovasteen saaneiden potilaiden kasvainnäytteitä toisistaan.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science
Department of Biological and Environmental Science
Cell and Molecular biology

Emmi Lindroos Predicting anti-PD-1 immunotherapy treatment outcome in solid tumors

MSc thesis: 27 p., 1 appendix (1 p.)

Supervisors: MD PhD Juha Kononen, and PhD Nina Rintanen

Inspectors: MD PhD Jan Böhm, and PhD Jatta Saarenheimo

October 2018

Keywords: biomarker, PD-L1, PD-1, predictive, T-lymphocyte

Cancer immunotherapy is a promising strategy for cancer treatment, however, it results in durable clinical responses only in a proportion of patients. Thus, there is a growing need to identify biomarkers that could enlighten the interaction between tumor and the immune system and predict treatment outcome. The aim of this study was to describe the immune microenvironment of 18 pre-treatment solid tumor specimens from patients treated with anti-PD-1 immunotherapy in Central Finland Central Hospital. Anti-PD-1 immunotherapy targets the T-lymphocyte inhibitory programmed cell death-1 (PD-1) receptor activated by programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) which is expressed by tumor cells in many cancers. Tumor PD-L1 expression is, thus, considered an important factor predicting the treatment outcome. In addition to determining tumor cell PD-L1 expression, the tumor-infiltrating CD3+ and CD8+T-lymphocytes, as well as their PD-1 expression, were assessed by immunohistochemistry and digital pathology for interrelationships and potential correlations with treatment outcome. A marked infiltration of CD3+ and CD8+T-lymphocytes in the centre of tumor was detected in all specimens. Seven specimens showed PD-L1 expression in less than 1 % of tumor cells, six in 1–50 % of tumor cells, and five in more than 50 % of tumor cells. There were more PD-1-positive lymphocytes in PD-L1-positive than negative specimens. High PD-L1 expression was associated with higher CD8+T-lymphocyte content in the tumor margin. Five out of six patients who responded well to anti-PD-1 therapy had PD-L1-positive and T-lymphocyte-rich tumor specimen, supporting the hypothesis that the presence of an adaptive immune resistance is associated with better treatment outcome. However, it was seen that the complexity of the tumor-host interplay does make simple immunohistochemical biomarkers challenging in immunotherapy.

SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO	1
1.1	Kasvaimen immunologinen mikroympäristö	1
1.2	Immuunimuovausteoria	4
1.3	Anti-PD-1 immunoterapia	5
1.4	Biomarkkerit ja yksilöllistetty lääketiede	6
1.4.1	Anti-PD-1 immunoterapialle prediktiiviset biomarkkerit . . .	6
1.5	Tutkimuksen tausta ja tavoitteet	7
2	AINEISTO JA MENETELMÄT	8
2.1	Potilastapaukset	8
2.2	Immunohistokemia	9
2.3	Digitointi ja kuva-analyysi	9
3	TULOKSET	10
3.1	T-lymfosyytti-infiltraatio	10
3.2	PD-1- ja PD-L1-positiivisuus	12
3.3	T-lymfosyyttien määrä eri PD-L1-luokissa	14
3.4	T-lymfosyyttien määrä, PD-1- ja PD-L1-positiivisuus sekä hoitovaste	15
4	TULOSTEN TARKASTELU JA JOHTOPÄÄTÖKSET	17
	KIITOKSET	23
	KIRJALLISUUS	23
	LIITE 1. Kasvainnäytteiden lymfosyyttien PD-1 ekspresio ja kasvainsolujen PD-L1-positiivisuus	

LYHENTEET

CTLA-4	sytotoksinen T-lymfosyyttiantigeeni 4
FDA	Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto
IDO	indoleamiini-2,3-dioksygenaasi
MDSC	myeloidiperäinen suppressorisolu
NK	luonnollinen tappajasolu
PD-1	programmed death-1
PD-L1 ja 2	programmed death-ligandi 1 ja 2

1 JOHDANTO

Immuunijärjestelmän kaksijakoinen rooli pahanlaatuisten solujen eliminaatiossa ja syövän paranemisessa, ja toisaalta kasvaintaudin kehittymisessä ja etenemisessä on tarkentunut kuluvan vuosikymmenen aikana (Palucka ja Coussens 2016). Lisääntynyt tieto kasvaimen ja immuunijärjestelmän välisestä vuorovaikutuksesta on mahdollistanut myös uusien ja tehokkaiden immunologisten syöpähoitojen kehittämisen. Immunologisten syöpähoitojen, esimerkiksi anti-PD-1 immunoterapian, avulla kasvaintauti pyritään parantamaan epäsuorasti immuunijärjestelmän välityksellä ja niillä on saatu erittäin hyviä hoitotuloksia (Couzin-Frankel 2013). Koska jo itsessään monimutkaisen immuunijärjestelmän toiminnassa on yksilöllistä vaihtelua ja jokainen kasvaintauti on omanlaisensa, ei kasvaimen ja immuunijärjestelmän välisen dynaamisen vuorovaikutuksen muokkaaminen halutunlaiseksi ole kuitenkaan yksinkertaista.

1.1 Kasvaimen immunologinen mikroympäristö

Kasvain ei ole vain jakautuvien syöpäsolujen muodostama massa vaan monimutkainen kudos, jossa on useita toistensa kanssa vuorovaikuttavia solutyyppejä (Hanahan ja Weinberg 2011). Kasvainsolut ja ympäröivät solut sekä soluväliaine muodostavat kasvainmikroympäristön, joka kokonaisuutena vaikuttaa syöpätaudin kehittymiseen (Hanahan ja Weinberg 2011, Wang ym. 2017). Kasvainmikroympäristössä tavataan yleisesti useita synnynnäisen sekä adaptiivisen immuunijärjestelmän soluja, muun muassa makrofageja, neutrofiilejä, eosinofiilejä, dendriittisoluja, myeloidiperäisiä suppressorisoluja (MDSC), luonnollisia tappajasoluja (NK-solut) sekä B- ja T-lymfosyytteja (Coussens ja Werb 2002, Pages ym. 2010, Gabrilovich ym. 2012, Becht ym. 2016). Näiden solujen määrä, keskinäinen suhde ja usein myös vaikutus vaihtelevat eri kasvainmikroympäristöissä, mutta ne voidaan yksinkertaistetusti jakaa kasvaimenvastaisiin ja kasvaimen kasvua edistäviin soluihin:

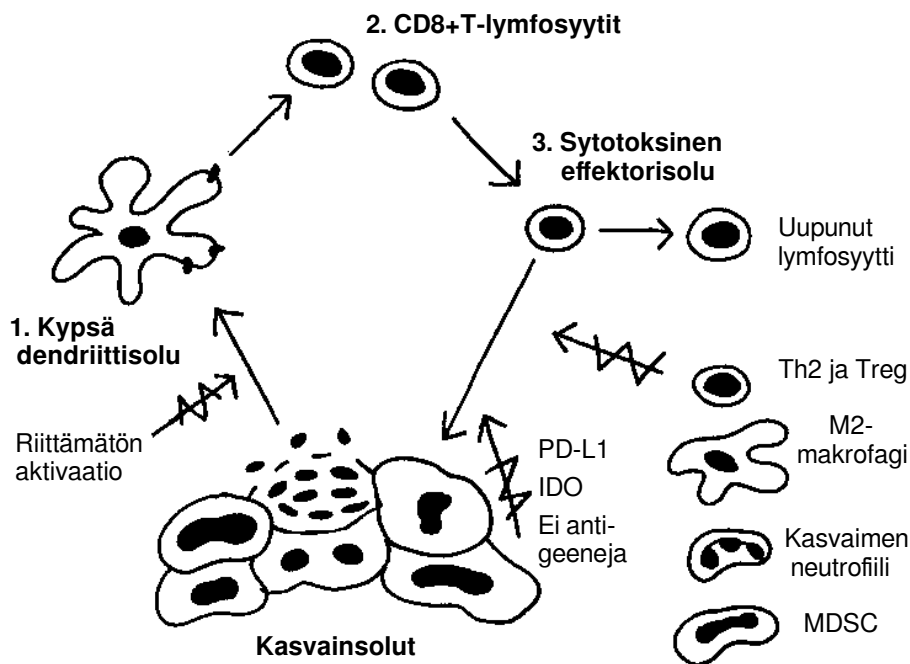
Kasvaimenvastaiset solut ovat niitä kasvainympäristössä tavattavia immuunijärjestelmän soluja, joilla on kyky saada aikaan immuunivaste pahanlaatuisille soluille. Dendriittisolut ovat antigeenia esitteleviä soluja ja erittäin tehokkaita T-lymfosyyttien aktivoijia (Guermontprez ym. 2002). Epäkypsät dendriittisolut keräävät jatkuvasti näytteitä kudoksessa ja prosessoivat peptidejä, esimerkiksi kasvainantigeeneja, pinnalleen esiteltäväksi. Jos dendriittisolu kypsyy ja vaeltaa imusolmukkeeseen, se voi saada aikaan kasvainantigeenispesifisen

CD8+T-lymfosyyttiaktivaation ja kasvaimenvastaisen immuunivasteen (Kuva 1). CD8+T-lymfosyytteja pidetään tärkeimpinä kasvaimenvastaisen immuunivasteen toimeenpanijoista (Apetoh ym. 2015). CD8 on T-solureseptorin koreseptori ja spesifinen luokan I MHC-proteiinille, joten CD8+T-lymfosyytit kykenevät reagoimaan solunsisäisiin antigeeneihin ja siten muun muassa pahanlaatuisiin soluihin. Aktivoitunut CD8+T-lymfosyytti on sytotoksinen efektorisolu, joka kohdatessaan kohdesolunsa hallitusti vapauttaa sytotoksisia molekyylejä: perforiinia ja grantsyymeja. Kasvainsolun kuollessa uusia antigeeneja vapautuu ja toinen kasvaimenvastaisen immuunireaktion kierros käynnistyy (Chen ja Mellman 2013). Kasvaimissa tavataan yleisesti myös NK-soluja, jotka ovat CD8+T-lymfosyyttien kaltaisia, mutta MHC-riippumattomia, ja ne luokitellaan osaksi synnynnäistä immuunijärjestelmää (Gajewski ym. 2013). CD4+T-lymfosyyteilla on useita eri fenotyyppisiä, mutta yleisesti ottaen ne säätelevät muiden immuunijärjestelmän solujen toimintaa erittämällä sytokiineja (Luckheeram ym. 2012). Th1 on CD4+T-lymfosyytin fenotyyppi, joka aktivoi CD8+T-lymfosyytteja, ja siten edistää kasvaimenvastaista immuunivastetta.

Kasvaimen kasvua edistäviksi soluiksi voidaan kutsua niitä immuunijärjestelmän soluja tai niiden fenotyyppisiä, jotka vaikeuttavat kasvaimenvastaista immuunivastetta tai edesauttavat syövän leviämistä. Osa näistä soluista on elintärkeitä immuunijärjestelmän suppressorisoluja, joiden tehtävä on vaimentaa ja päättää immuunireaktioita, ja jotka osaltaan estävät autoimmuunireaktioita. CD4+T-lymfosyyttien fenotyypit Th2 sekä Treg liittyvät muun muassa allergisiin reaktioihin ja solunulkoisten parasiittien torjuntaan (Th2) sekä immuunivasteen päättymiseen ja immunologisen toleranssin syntyyn (Treg) (Luckheeram ym. 2012). Kasvainmikroympäristössä niiden erittämät sytokiinit joko suoraan vaimentavat CD8+T-lymfosyytteja tai aktivoivat muita immuunivastetta häiritseviä soluja. Kudoksen makrofageja on useaa eri fenotyyppiä, joista kasvainmikroympäristössä esiintyy erityisesti tyyppiä M2 (Gabilovich ym. 2012). M2-tyypin makrofagit erittävät sytokiineja, jotka muun muassa aktivoivat Th2-CD4+T-lymfosyytteja ja vaimentavat CD8+T-lymfosyytteja. Lisäksi ne edistävät kudoksen paranemista ja angiogeneesia, mikä voi edesauttaa kasvaimen leviämistä. Kasvainmikroympäristön neutrofiileilla on havaittu olevan sekä kasvainta estäviä että sen kasvua edistäviä vaikutuksia (Uribe-Querol ja Rosales 2015). Neutrofiilit erittävät molekyylejä, joiden tarkoitus on tuhota mikro-organismeja ja säädellä tulehdusreaktiota, ja jotka kasvainmikroympäristössä voivat edistää kasvaimen invaasiota ja metastasoitumista. Kasvainmikroympäristö tuottaa myös useita sytokiineja, jotka stimuloivat ja rekrytoivat

epäkypsiä myeloidisoluja ja edistävät niiden erilaistumista suppressorisoluiksi (Gabrilovich ym. 2012). MDSC-solut vaimentavat immuunivastetta muun muassa aktivoimalla Treg-soluja, estämällä T-lymfosyyttien ravinteiden saantia ja aiheuttamalla kasvainmikroympäristössä lymfosyytteja häiritsevää oksidatiivista stressiä. Niitä tavataan yleisesti kasvaimissa.

Kasvain on immuunijärjestelmälle monimutkainen haaste: se on samanaikaisesti omaa ja vierasta kudosta ja antigeenitaakka on usein suuri. Vaikka immuunijärjestelmällä on tehokkaita aseita pahanlaatuisten solujen eliminoimiseksi, sillä on myös ominaisuuksia, joiden vuoksi kasvaintauti voi alkaa edetä hallitsemattomasti. Kasvaimen dynaaminen immunologinen mikroympäristö voikin muistuttaa kroonisesti tulehtunutta kudosta, jossa tulehdusvastetta ei saada päätökseen ja jossa tapahtuu samanaikaisesti sekä kudoksen tuhoa että korjausta (Hanahan ja Weinberg 2011).



Kuva 1: Kasvaimenvastainen immuunivaste ja eräitä sen haasteita. Immuunivasteen avainkohtia ovat dendriittisolun kypsyminen kasvainmikroympäristössä (1), sen vaeltaminen imusolmukkeeseen aktivoimaan CD8+T-lymfosyytteja (2) ja CD8+T-lymfosyyttien aktivoituminen kasvainantigeenispesifisiksi sytotoksisiksi effektorisoluiksi (3). Immuunivasteen haasteita ovat muun muassa dendriittisolun riittämätön aktivaatio, sytotoksisen effektorisolun uupuminen, kasvainsolujen riittämätön antigeeniekspressio tai niiden tuottamat immunosuppressiiviset molekyylit kuten PD-L1 ja IDO. Kasvainmikroympäristössä on usein myös immunosuppressiivisia tai kasvaimen kasvua edistäviä soluja, kuten Th2- ja Treg-CD4+T-lymfosyytteja, M2-makrofageja, kasvaimen neutrofiileja ja myeloidiperäisiä suppressorisoluja (MDSC).

1.2 Immuunimuovausteoria

Kasvaimen immunologisen mikroympäristön vuorovaikutuksia yksinkertaistetusti kuvaavan immuunimuovausteorian mukaan immuunijärjestelmän ja kasvainsolujen välisellä vuorovaikutuksella voi olla kolmenlaisia seurauksia: kasvaimen eliminaatio, tasapainotila tai kasvaimen pako immuunijärjestelmältä (Mittal ym. 2014).

Kasvaimen eliminaatio edellyttää aktiivista kasvaimenvastaista immuunivastetta, jonka lähtökohta on että immuunijärjestelmä erottaa syöpäsolun terveestä kudoksesta. Genominen epävakaus on yksi syöpäsolujen ominaispiirre, joka tuottaa syöpäsoluille pahanlaatuisia ominaisuuksia, kuten kyvyn ylläpitää jakautumista ja vastustaa solukuolemaa, mutta myös uusia antigeenejä, jotka immuunijärjestelmä voi tunnistaa vieraiksi (Hanahan ja Weinberg 2011). Dendriittisolut ovat avainasemassa siinä, millaisen immuunivasteen kasvain saa aikaan (Guermontprez ym. 2002). Ilman aktivaatiosignaalia, esimerkiksi tulehdussytokiineja, dendriittisolu ei kypsy tehokkaaksi antigeenia esitteleväksi soluksi eikä kykene aktivoimaan T-lymfosyyttejä (Guermontprez ym. 2002). Tämä vähentää autoimmuunireaktioita, mutta on toisaalta eräs syövänvastaisen immuunireaktion haasteista.

Tasapainotilassa pahanlaatuisten solujen täydellinen eliminaatio ei onnistu, mutta kasvaintauti pysyy piilevänä. Immuunijärjestelmän efektori- ja suppressorisolujen välinen suhde voi vaikuttaa siihen, pysyykö kasvain piilevänä vai alkaako se suurentua ja levitä saaden aikaan kliinisesti merkittävän taudin (Mittal ym. 2014). Immuunimuovausteorian mukaan immuunijärjestelmä vaikuttaa kasvaimen immunogeenisyyteen tasapainotilan aikana: kasvainantigeenejä ekspressoivat solut eliminoidaan ja jäljelle jäävät ne muuntuneet solut, jotka eivät tuota sopivia kasvainantigeenejä, ilmennä niitä pinnallaan tai jotka onnistuvat kehittämään immuunijärjestelmää suppressoivan kasvainmikroympäristön (Mittal ym. 2014, Munn ja Bronte 2016). Nämä vähemmän immunogeeniset tai efektorisoluja muuten pakoilevat solut saavat valintaedun ja yleistyvät murtaen immuunijärjestelmän muodostaman padon.

Kasvaimen pako on seurausta immuunijärjestelmän otteen kirpoamisesta. Immuunijärjestelmässä on suppressorisolujen lisäksi muitakin säätelymekanismeja, joiden tarkoitus on päättää immuunireaktio ajallaan ja estää autoimmuunireaktioita. Tällaisia ovat esimerkiksi tarkistuspiistemolekyylit, kuten aktivoituneiden CD8+T-lymfosyyttien pinnalla olevat CTLA-4 (sytotoksinen T-lymfosyyttiantigeeni 4) ja PD-1 (programmed death-1) sekä useissa kudoksissa ekspressoitava immunosuppressiivinen IDO (indoleamiini-2,3-dioksygenaasi)

(Munn ja Bronte 2016). Syöpäkudosten on huomattu hyödyntävän näitä kaikkia. Kuten pitkittyneessä infektiossa, krooninen stimulaatio ja suuri antigeenitaakka voivat saada CD8+T-lymfosyytit myös uupumaan kasvainmikroympäristössä, ja niiden effektoritoiminto hiipuu (Wherry 2011).

1.3 Anti-PD-1 immunoterapia

Aktiivinen kasvaimenvastainen immuunivaste on pyritty käynnistämään ja pitämään yllä muun muassa manipuloimalla CD8+T-lymfosyytteja, dendriittisolurokotteilla ja estämällä tarkistusproteineja CTLA-4:ä ja PD-1:tä (Couzin-Frankel 2013, Topalian ym. 2015b). Anti-PD-1 immunoterapian kohde, PD-1, on aktivoituneiden T-lymfosyyttien pinnalla ekspressoituva reseptori, jonka aktivaatio estää solun effektoritoimintoja ja lisää sen liikkuvuutta kudoksessa, jolloin kontakti kohdesolujen kanssa vähenee (Topalian ym. 2015a). Lymfosyyteistä myös NK-solut ja B-solut voivat ekspressoida PD-1:tä (Simon ja Labarriere 2018). Reseptori PD-1 sitoo kahta ligandia: PD-ligandi 1 ja 2 (PD-L1 ja PD-L2). Aktivoituneet hematopoieettiset solut sekä epiteelisolut ekspressoivat PD-L1:tä vastena aktiivisten immuunijärjestelmän solujen erittämälle tulehdusytokiini interferoni- γ :lle (Topalian ym. 2015a). Myös kasvainsolut voivat ekspressoida PD-L1:tä. PD-L2:ta ekspressoivat puolestaan aktivoituneet dendriittisolut ja makrofagit. Kasvainsolujen PD-L1 ekspressio voi olla joko pysyvää tai indusoituvaa (Ribas ja Hu-Lieskovan 2016). Pysyvä PD-L1 ekspressio voi johtua muutoksista kasvainsolujen geeneissä tai niiden säätelyssä. Indusoituva PD-L1 ekspressio, joka on todennäköisesti vaste kasvaimenvastaiselle immuunireaktiolle ja siten merkki adaptiivisesta immuuniresistenssistä, on pysyvää ekspressiota yleisempää ja yleensä kasvainkudoksessa epätasaista (Taube ym. 2012, Ribas ja Hu-Lieskovan 2016). Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto FDA on hyväksynyt syöpälääkkeiksi useita PD-1-reseptoriin sitoutuvia inhibiittoreita: esimerkiksi pembrolitsumabin, joka on immunoglobuliini-G4- κ humanisoitu monoklonaalinen vasta-aine sekä nivolumabin, joka on immunoglobuliini-G4 monoklonaalinen vasta-aine (Wang ym. 2014, Patnaik ym. 2015). Anti-PD-1 immunoterapialla on saatu hyviä hoitovasteita useissa eri kasvaintaudeissa, muun muassa melanoomassa, munuaiskarsinoomassa, keuhkosyövässä, Hodgkinin lymfoomassa sekä pään- ja kaulanalueen syövässä, jopa lähes 40 %:lla potilaista taudista riippuen (Sharma ja Allison 2015). Yleisimpiä anti-PD-1 immunoterapian haittavaikutuksia ovat erilaiset tulehdustilat, kuten dermatiitti, koliitti ja hepatiitti.

1.4 Biomarkkerit ja yksilöllistetty lääketiede

Biomarkkerit ovat molekyyliä, esim. proteiineja tai geenejä, jotka ovat mitattavissa kudoksesta tai kehon nesteestä ja indikoivat jotakin kliinisesti merkittävää tilaa (Mahoney ja Atkins 2014). Biomarkkerit voidaan luokitella niiden biologisen olemuksen mukaan muun muassa soluspesifisiin, esimerkiksi morfologiset tai immunofenotyyppiset biomarkkerit, ja kudospesifisiin, esimerkiksi geeniekspressioprofiili tai genotyyppi (Kourea ja Kotoula 2016). Biomarkkerit voidaan myös luokitella niiden kliinisen relevanssin mukaan esimerkiksi diagnostisiin, prognostisiin ja prediktiivisiin biomarkkereihin. Prognostisen ja prediktiivisen biomarkkerin ero on, että siinä missä prognostinen markkeri korreloi kasvaintaudissa taudin luonnollisen etene-
misen kanssa ennustaen esimerkiksi uusiutumiseriskää tai elossaoloaikaa, prediktiivinen biomarkkeri ennustaa jonkin tietyn hoidon tehoa tai mahdollista toksisuutta (Mahoney ja Atkins 2014). Yksilöllistetty lääketiede tarkoittaa kunkin yksilön ominaispiirteiden huomioimista sekä tautien ennaltaehkäisyssä että niiden hoidossa (Collins ja Varmus 2015). Yksilöllistetyn lääketieteen menetelmien kehittäminen ja laajamittainen käyttöönotto edellyttää kattavien biologisten tietokantojen ylläpitoa, potilaiden tehokasta karakterisointia ja valmiutta analysoida suuria tietomääriä. Koska anti-PD-1 immunoterapia tehoaa vain osalla potilaista, siihen voi liittyä vakavia haittavaikutuksia ja se on kallista, yksilöllistetyn lääketieteen periaatteen soveltaminen immunoterapian käytössä on perusteltua (Masucci ym. 2016). Tätä varten täytyy etsiä, arvioida ja validoida anti-PD-1 immunoterapialle prediktiivisiä biomarkkereita.

1.4.1 Anti-PD-1 immunoterapialle prediktiiviset biomarkkerit

Hyvä anti-PD-1 immunoterapialle prediktiivinen biomarkkeri todennäköisesti kuvaa kasvaimen ja immuunijärjestelmän välistä dynamiikkaa, vaikka muitakin vaihtoehtoja, esimerkiksi suoliston mikrobikannan roolia tutkitaan (Sivan ym. 2015, Kourea ja Kotoula 2016). Hyvä biomarkkeri on myös helposti määritettävissä kasvainkudoksesta tai solumateriaalista (Kourea ja Kotoula 2016). Koska anti-PD-1 immunoterapian toimintamekanismi on todennäköisesti ensisijaisesti tehostaa ja vapauttaa olemassa olevaa kasvaimenvastaista immuunivastetta, hoidolle prediktiivisiksi biomarkkereiksi on tutkittu muun muassa kasvaimen T-lymfosyytti-infiltraatiota, kasvainantigeenien ja mutaatiotaakan määrää sekä PD-1 ja PD-L1 ekspressiota (Tumeh ym. 2014, Spencer ym. 2016). Toisaalta koska vuorovaikutukset kasvainmikroympäristössä ovat monimutkaisia, indusoituvia ja dynaamisia sekä ajallisesti että sijainnillisesti, kasvaimen ja immuunijärjestelmän rajapintaa on todennäköisesti profiloitava moniulotteisemmin integroimalla prediktiiviseen testiin useita eri biomarkkereita (Masucci

ym. 2016, Spencer ym. 2016). Biomarkkerikehitykseen liittyy monimutkaisen biologian lisäksi muitakin haasteita: tutkimusasetelmat ovat usein retrospektiivisiä ja mittaamisen ja tulkinnan variabiliteetti on erityisesti varhaisissa biomarkkeritesteissä suurta, joten tulosten vertailukelpoisuus on pieni (Spencer ym. 2016). Biomarkkeritestiltä vaaditaan korkeaa analyttistä ja kliinistä validiteettia sekä kliinistä utiliteettia (Hayes 2016). Nämä vaatimukset voivat täytyä, kun testi on käytännöllinen ja sen mittaustarkkuus ja toistettavuus ovat suuria, ja kun testin tulos jakaa populaation kahteen tai useampaan ryhmään, jotka eroavat hoitotulostensa perusteella tilastollisesti merkitsevästi. Hoitotulosten pitää myös olla tilastollisesti merkitsevästi parempia silloin kun testi on käytössä verrattuna siihen että se ei samassa kliinisessä kontekstissa ole.

1.5 Tutkimuksen tausta ja tavoitteet

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli määrittää Keski-Suomen keskussairaalassa ennen kesää 2017 anti-PD-1 immunoterapialla hoidettujen syöpäpotilaiden ennen hoidon aloitusta otettujen kasvainnäytteiden immunologisen mikroympäristön tila, ja etsiä korrelaatiota sen ja hoitovasteen välillä. Kasvainnäytteistä määritettiin immunohistokemian ja kvantitatiivisen kuva-analyysin avulla CD3- ja CD8-positiivisten T-lymfosyyttien lukumäärä kasvainalueella sekä kasvaimen reuna-alueella. CD3 on T-solureseptorin ko-reseptori ja ilmentyy sekä CD4+ että CD8+T-lymfosyyttien pinnalla kun taas anti-CD8 vasta-aine on kasvainkudoksessa spesifinen sytotoksisille efektorisoluille. Lisäksi määritettiin semikvantitatiivisesti kasvainalueen lymfosyyttien PD-1 ekspressio sekä kasvainsolujen PD-L1 ekspressio niille spesifisten vasta-aineiden avulla. Kaikki neljä vasta-ainetta ovat rutiinikäytössä Keski-Suomen keskussairaalan patologian laboratoriossa, ja niitä on käytetty paljon kasvaimen immunologisen mikroympäristön kartoittamiseen eri tutkimusasetelmissa (Angell ja Galon 2013, Berghoff ym. 2016, Kitano ym. 2017). Kasvainnäytteet luokiteltiin lymfosyytti-infiltraation määrän sekä PD-1 ja PD-L1 ekspresion perusteella sekä etsittiin mahdollisia keskinäisiä korrelaatioita eri luokkien välillä. Tarkoitus oli selvittää, erottuvatko immunologisesti aktiiviset ja epäaktiiviset näytteet toisistaan tässä tutkimusjoukossa. Lopuksi tutkittiin miten eri tekijät yksittäin tai yhdistelmänä vertautuvat potilaiden anti-PD-1 immunoterapiahoitovasteisiin. Hypoteesina oli, että potilaat, joiden kasvainnäytteet todettiin immunologisesti aktiivisiksi ja joissa nähtiin adaptiivinen immuuniresistenssi olivat saaneet paremman hoitovasteen kuin potilaat, joiden näytteet vaikuttivat immunologisesti epäaktiivisilta. Tämän tutkimuksen aineisto kuului Juha Konosen laajempaan tutkimukseen "Drug resistance

and sensitivity screening assay for solid tumors", jolla on KSSH:n tutkimuseettisen lautakunnan hyväksyntä (6/2015).

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Potilastapaukset

Tutkimukseen valittiin kasvainnäytteet 18 potilaalta, joiden syöpää oli hoidettu anti-PD-1 immunoterapialla (nivolumabi tai pembrolitsumabi) Keski-Suomen keskussairaalassa tammikuun 2015 ja kesäkuun 2017 välillä. Kaksi heistä oli saanut lisäksi anti-CTLA-4 immunoterapiaa (ipilimumabi). Kunkin potilaan kasvainnäyteblokeista valittiin kokeneen patologin avustuksella se, jossa oli edustavimmin kasvainta ja mahdollisesti elimen parenkyymiin tai sidekudokseen rajoittuvaa reuna-aluetta. Jos potilaasta oli otettu näytteitä useina eri ajankohtina, pyrittiin valitsemaan mahdollisimman uusi, kuitenkin ennen hoidon aloitusta otettu näyte. Valtaosa kasvainnäytteistä oli melanoomametastaaseja (Taulukko 1). Lisäksi tutkimuksessa oli mukana erilaisia kiinteitä kasvaimia, joista osa oli primäärikasvaimia ja osa residiivikasvaimia tai metastaaseja. Potilaista 16 oli elossa heinäkuussa 2017 .

Taulukko 1: Potilastapausten kliiniset tiedot. PAD on patologin tekemä patologi-anatominen diagnoosi ja hoitovaste perustuu hoitavan lääkärin tekemään arvioon elokuussa 2017. Hoitovaste 2 tarkoittaa osittaista tai täydellistä hoitovastetta, 1 stabiilia tautia ja 0 etenevää tautia.

Potilastapaus	PAD	Näyte	Immunoterapia	Hoitovaste
A	hodgkinin lymfooma	imusolmuke	nivolumabi	2
B	melanooma	sylikirauhanen	nivolumabi, ipilimumabi	1
C	kirkassolukarsinooma	munuainen	nivolumabi	2
D	melanooma	pehmytkudosmetastaasi	nivolumabi	0
E	adenokarsinooma	imusolmuke	nivolumabi	2
F	melanooma	pehmytkudosmetastaasi	nivolumabi	2
G	melanooma	maksametastaasi	nivolumabi	0
H	melanooma	keuhkopussimetastaasi	nivolumabi	n/a
I	kirkassolukarsinooma	munuainen	nivolumabi	n/a
J	melanooma	maksametastaasi	nivolumabi	2
K	levyepiteelikarsinooma	välükarsina	nivolumabi, ipilimumabi	0
L	melanooma	nenäontelon jäännöskasvain	nivolumabi	n/a
M	melanooma	nenäontelon metastaasi	nivolumabi	n/a
N	munuaiskarsinooma	munuainen	nivolumabi	n/a
O	adenokarsinooma	rinta	pembrolitsumabi	0
P	alveolaarinen pehmytosasarkooma	keuhko	pembrolitsumabi	n/a
Q	levyepiteelikarsinooma	keuhko	pembrolitsumabi	n/a
R	melanooma	pehmytkudos	nivolumabi	2

2.2 Immunohistokemia

Arkistoiduista formaliiniin fiksoiduista ja parafiiniin valetuista (FFPE) kasvainkudosnäyteblokeista leikattiin liukumikrotomilla 3 µm:n leikkeitä, jotka kiinnitettiin lämpölevyllä (60 °C, 10 min) mikroskooppilaseille. Antigeenien paljastamiseksi kudokset leikkeitä tehtiin Bond Epitope Retrieval solution 2 -käsittely: CD3:lle, CD8:lle ja PD-1:lle 20 minuutin ja PD-L1:lle 30 minuutin inkubaatiolla. Näytteet värjättiin Leica Bond-III IHC-värjäysautomaatilla rutiinimenetelmän mukaan käyttäen Bond Polymer Refine Detection Kit -reagensseja. CD3-vasta-aineena käytettiin hiiren monoklonaalista vasta-ainetta (Novocastra™, NCL-L-CD3-565, Leica Biosystems) laimennettuna 1:50, CD8-vasta-aineena käytettiin kanin monoklonaalista vasta-ainetta (klooni SP16, RM-9116, Thermo Scientific) laimennettuna 1:100, PD-1 vasta-aineena käytettiin kanin monoklonaalista vasta-ainetta (klooni SP269, Spring Bioscience) laimennettuna 1:50 ja PD-L1 vasta-aineena käytettiin kanin monoklonaalista vasta-ainetta (E1L3N®XP®Rabbit mAb #b 13684, Cell Signaling Technology) laimennettuna 1:100. Inkubaatioaika oli 30 minuuttia. Vasta-ainevärjäyksen jälkeen kudokset poistettiin vesi ksyleenikäsittelyllä (1 min virtaava vesi, 1 min UHP-vesi, 1 min 70% etanoli, 3 min absoluuttinen etanoli ja 2 x 5 min ksyleeni) ja lasit päällystettiin peitinlasiautomaatilla (Leica CV5030). Positiivisena ja negatiivisena kontrollikudoksena käytettiin tonsillaa, jossa voidaan nähdä sekä CD3+ ja CD8+T-lymfosyyttejä että PD-L1- ja PD-1-positiivisia ja negatiivisia soluja ja lisäksi intensiteetiltään eri vahvuista värjäytymistä (Agilent 2018).

2.3 Digitointi ja kuva-analyysi

Näytteet digitoitiin näytelasiskannerilla (NanoZoomer XR, Hamamatsu, Japan) 20X ja 40X objektiivisuurenoksilla. Kuvien digitaalinen analysointi tehtiin QuPath-ohjelmalla (0.1.2) (Bankhead ym. 2017).

CD3- ja CD8-positiiviset T-lymfosyytit laskettiin 20X objektiivisuurenoksista käyttäen QuPathin positiivisten solujen detektointi -toimintoa optimoimalla kunkin kuvan kohdalla parametrit niin, että väärin positiivisten ja väärin negatiivisten solujen määrä oli silmämääräisesti katsottuna mahdollisimman pieni. Kuvista laskettiin CD3-positiiviset T-lymfosyytit kasvainalueelta näytteestä riippuen 2-5 eri kohdasta, keskimäärin 1,9 mm²:n alueelta kustakin näytteestä ja kasvaimen reuna-alueelta 1-3 eri kohdasta, keskimäärin 0,3 mm²:n alueelta kustakin näytteestä. CD8-positiiviset T-lymfosyytit laskettiin vastaavasti kasvainalueelta 2-5 kohdasta, keskimäärin 1,6 mm²:n alueelta kustakin näytteestä

ja kasvaimen reuna-alueelta 1-3 kohdasta, keskimäärin 0,2 mm²:n alueelta kustakin näytteestä.

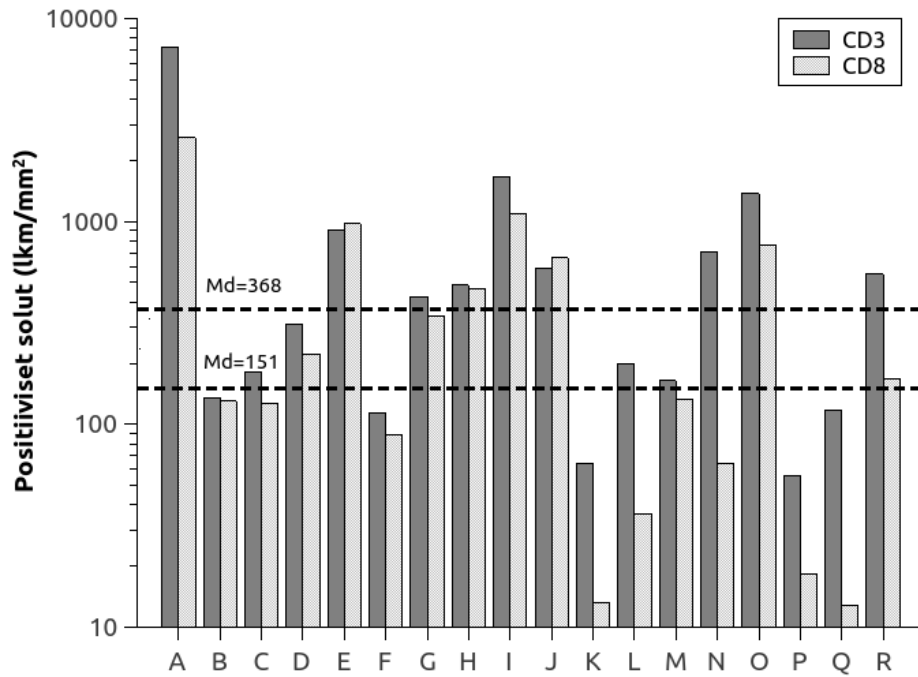
Kasvaimen lymfosyyttien PD-1-positiivisuus määritettiin 40X-suurennoista koko kasvainalueelta ottaen huomioon sekä heikko että vahva lymfosyyttien PD-1 ekspressio. Näytteet arvioitiin PD-1-positiivisuuden suhteen negatiivisiksi (0), jos positiivisia soluja oli korkeintaan yksi, hieman positiivisiksi (+), jos positiivisia soluja oli 1-10 ja positiivisiksi (++), jos positiivisia soluja oli tätä enemmän. PD-1 -positiivisten (++) kasvainnäytteiden lymfosyyttien PD-1 ekspression voimakkuutta arvioitiin silmämääräisesti.

Kasvainsolujen PD-L1-positiivisuus määritettiin käyttäen aikaisemmin määritettyjä kriteerejä (Agilent 2018): Sekä osittainen että täydellinen solukalvon värjäytyminen otettiin huomioon ja värjäytyminen sai olla heikkoa tai vahvaa. Sytoplasman värjäytymistä ei huomioitu. Nekroottiset kasvainsolut jätettiin määrittelyn ulkopuolelle. Alustava PD-L1-positiivisuuden määrittely tehtiin valomikroskoopilla kokeneen patologin avustuksella ja sen jälkeen tarkempi määrittely QuPath-ohjelman avulla. Kuva jaettiin ruudukkoon (kunkin ruudun koko n. 250 µm x 250 µm) ja jokainen ruutu arvioitiin erikseen. Ruutu hylättiin, jos siinä oli kasvainkudosta alle 70 % ruudun pinta-alasta, esimerkiksi verisuonten kohdalla tai lymfosyyttirikkailla alueilla. Jokainen hyväksyty ruutu arvioitiin positiiviseksi tai negatiiviseksi siten, että jos ruudussa oli korkeintaan yksittäinen PD-L1-positiivinen solu, oli ruutu negatiivinen. PD-L1-positiiviset ruudut luokiteltiin karkeasti niiden positiivisuuden perusteella 2-3 eri ryhmään ja koko näytteen positiivisuus määritettiin kaikkien ruutujen positiivisuuden keskiarvona. Jos näytteessä oli <1 %:n PD-L1-positiivisuus, sen katsottiin olevan PD-L1-negatiivinen.

3 TULOKSET

3.1 T-lymfosyytti-infiltraatio

Kaikissa näytteissä oli kasvainalueella sekä CD3+ että CD8+T-lymfosyytteja (Kuva 2). CD3+T-lymfosyyttien määrä näytteiden kasvainalueella vaihteli välillä 56–7276 solua/mm². CD8+T-lymfosyyttien määrä näytteiden kasvainalueella vaihteli välillä 13–2586 solua/mm².

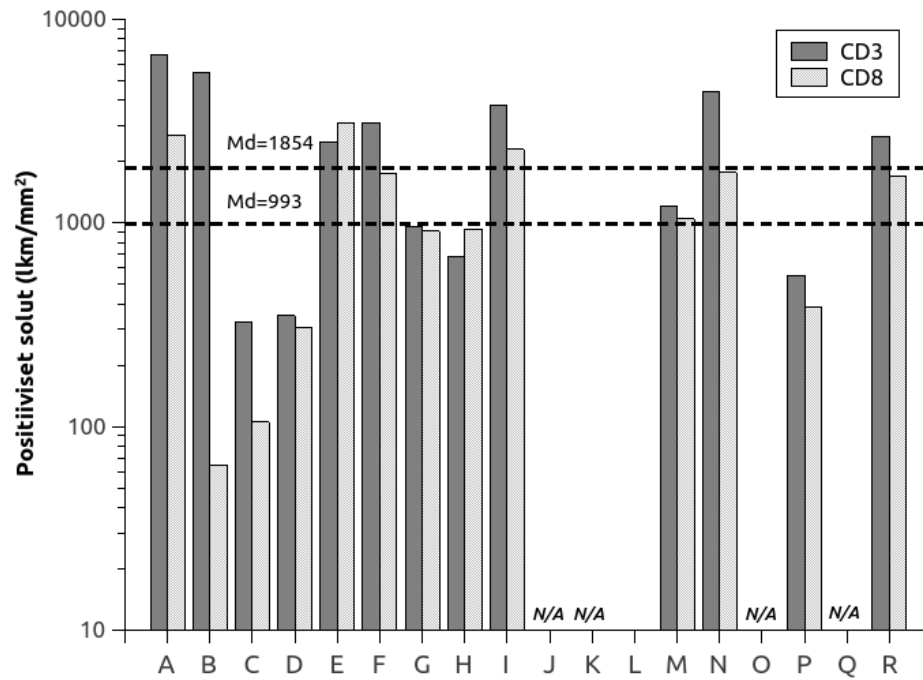


Kuva 2: Kasvainalueen CD3- ja CD8-positiiviset T-lymfosyytit (lkm/mm²). Md=368 on CD3+T-lymfosyyttien määrän mediaani ja Md=151 on CD8+T-lymfosyyttien määrän mediaani.

Useissa kasvainnäytteissä oli immunologisesti hyvin aktiivinen elimen parenkyymin tai sidekudokseen rajoittuvaa reuna-alue (Kuva 3). CD3+T-lymfosyyttien määrä kasvaimen reuna-alueella vaihteli näytteissä välillä 0–6700 solua/mm². CD8+T-lymfosyyttien määrä kasvaimen reuna-alueella vaihteli näytteissä välillä 0–3090 solua/mm². Kasvainnäytteet pisteytettiin kasvaimen ja reuna-alueen CD3- ja CD8-positiivisten solujen lukumäärän mediaaniarvon suhteen, jotta voitiin erottaa paljon lymfosyytteja sisältävät näytteet vähän lymfosyytteja sisältävistä (Taulukko 2). Pisteytys tehtiin siten, että mediaaniarvosta tai sen ylittävistä määrästä soluja annettiin yksi piste. Näyte sai siten maksimin 4 pistettä, jos sekä CD3+ että CD8+T-lymfosyyttien määrä oli yhtä suuri tai enemmän kuin mediaaniarvo sekä kasvaimessa että kasvaimen reuna-alueella.

Taulukko 2: Kasvainnäytteet jaettuna pisteluokkiin CD3+ ja CD8+T-lymfosyyttien määrän perusteella. *)Näytteet J, K, O ja Q pisteytettiin vain kasvainalueen lymfosyyttien perusteella.

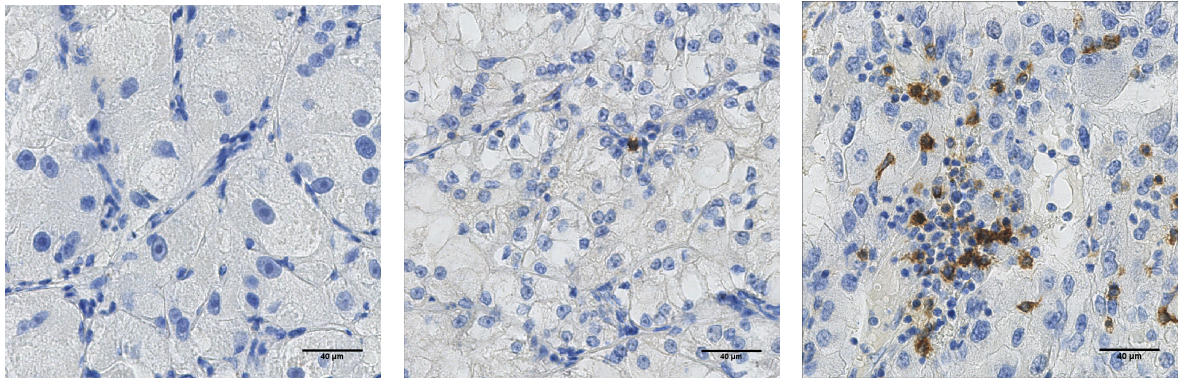
LYMFOSYYTTIPISTEET	KASVAINNÄYTE
0-1	B, C, D, K*, L, M, P, Q*
2	E, G, H, J*, O*
3-4	A, I, N, R



Kuva 3: Kasvaimen reuna-alueen CD3- ja CD8-positiiviset T-lymfosyytit (lkm/mm²). Md=1854 on CD3+T-lymfosyyttien määrän mediaani ja Md=993 on CD8+T-lymfosyyttien määrän mediaani. Näytteissä J, K, O ja Q ei ollut kasvaimen reuna-alueita.

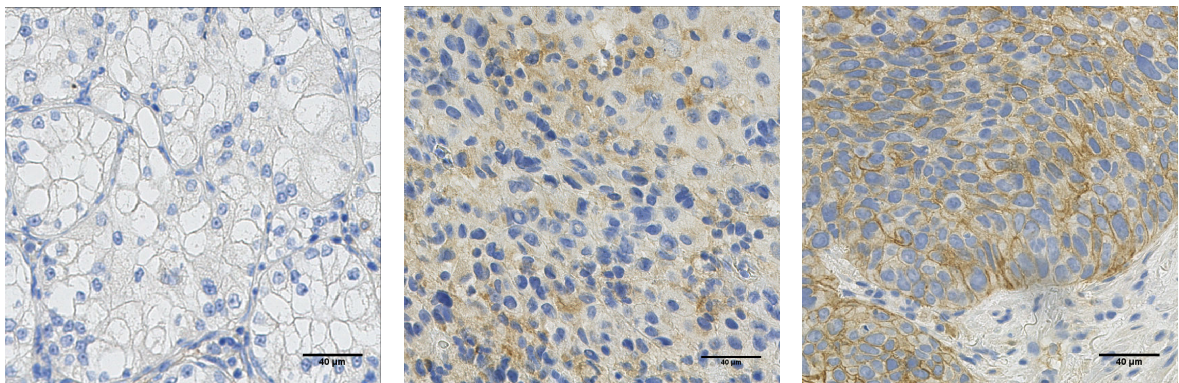
3.2 PD-1- ja PD-L1-positiivisuus

PD-1-positiivisuus määritettiin 17:stä kasvainnäytteestä. Luokkaan (0, negatiivinen) kuului kaksi näytettä, luokkaan (+) kahdeksan näytettä ja luokkaan (++) seitsemän näytettä (Kuva 4, Liite 1). Lymfosyyttien PD-1 ekspression intensiteetti vaihteli voimakkaan ja heikon välillä: selvästi PD-1-positiivisissa (++) kasvainnäytteissä nähtiin yleisesti sekä heikkoa että voimakasta PD-1 ekspressiota (Kuva 4c). PD-L1-positiivisuus määritettiin 18:sta kasvainnäytteestä. PD-L1-negatiivisia kasvainnäytteitä oli seitsemän, kuuden kasvainnäytteen PD-L1-positiivisuus oli välillä 1–50 % ja viiden kasvainnäytteen PD-L1-positiivisuus oli >50 % (Kuva 5, Liite 1). Kasvainnäytteet, jotka kuuluivat PD-1-luokkaan (++) , olivat kaikki PD-L1-positiivisia (Taulukko 3). Sen sijaan PD-1-luokkaan (+) kuuluvista näytteistä kuusi oli PD-L1-negatiivisia ja kaksi >50 % PD-L1-positiivisia. Toinen PD-1-negatiivisista näytteistä oli PD-L1-negatiivinen ja toinen >50 % PD-L1-positiivinen.



(a) PD-1-negatiivinen (b) Hieman PD-1-positiivinen (+) (c) PD-1-positiivinen (++)

Kuva 4: Kasvaimen lymfosyyttien PD-1-positiivisuus. Voimakkaasti PD-1:tä ekspressoivat solut ovat värjäytyneet tummanruskeiksi ja heikosti ekspressoivat vaaleanruskeiksi.



(a) PD-L1-negatiivinen (<1 %) (b) Hieman PD-L1-positiivinen (1–50 %) (c) PD-L1-positiivinen (>50 %)

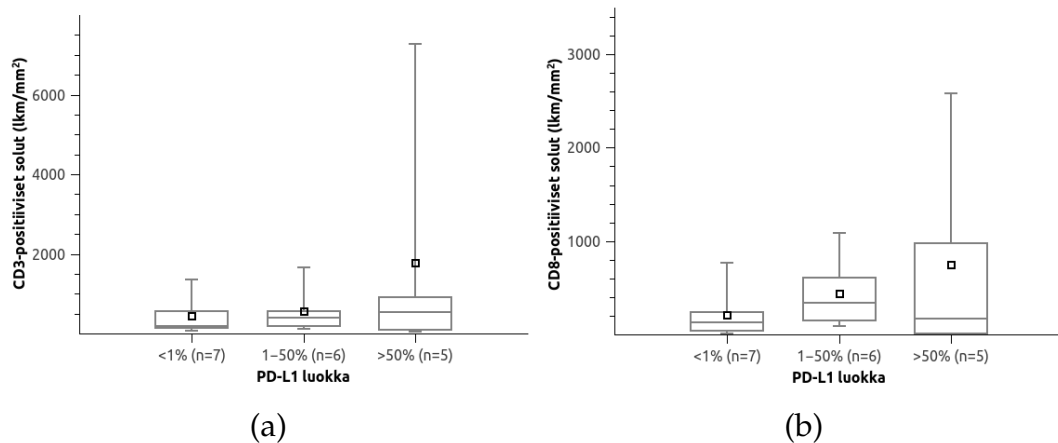
Kuva 5: Kasvainsolujen PD-L1-positiivisuus. Vain elinkykyisten kasvainsolujen solukalvon PD-L1 ekspresio, joka näkyy kuvassa ruskeana, otettiin huomioon.

Taulukko 3: Kasvainsolujen PD-L1 ekspresio verrattuna kasvaimen lymfosyyttien PD-1-positiivisuuteen. Esimerkiksi seitsemästä PD-L1-negatiivisesta (PD-L1-% <1) kasvainnäytteestä yksi oli PD-1-negatiivinen (0) ja kuudessa oli 1-10 PD-1-positiivista lymfosyyttia (+).

PD-L1-%	PD-1 (0)	PD-1 (+)	PD-1 (++)
<1	1	6	0
1-50	0	0	6
>50	1	2	1

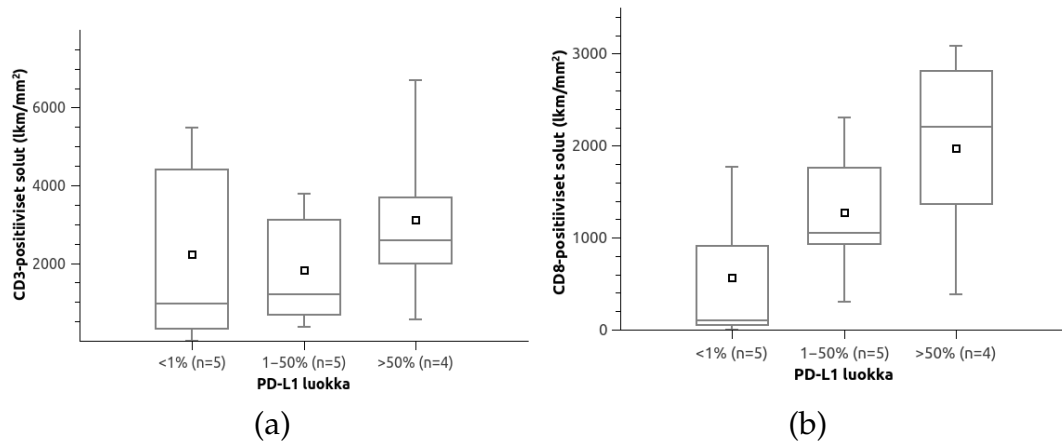
3.3 T-lymfosyyttien määrä eri PD-L1-luokissa

PD-L1-positiivisuuden ja kasvainalueen lymfosyyttien määrän välillä ei ollut selvää yhteyttä: vähän lymfosyytteja sisältävät kasvainnäytteet saattoivat olla PD-L1-positiivisia ja toisaalta PD-L1-negatiivisissa näytteissä saattoi olla paljon lymfosyytteja (Kuva 6). Kasvainalueen CD3-positiivisten T-lymfosyyttien määrän mediaani oli kuitenkin suurin PD-L1-luokassa >50 % (548 solua/mm²), toiseksi suurin luokassa 1–50 % (397 solua/mm²) ja pienin luokassa <1 % (198 solua/mm²) (Kuva 6a). Kasvainalueen CD8-positiivisten T-lymfosyyttien määrän mediaani oli suurin PD-L1-luokassa 1–50 % (344 solua/mm²), toiseksi suurin luokassa >50 % (168 solua/mm²) ja pienin luokassa <1 % (128 solua/mm²) (Kuva 6b).



Kuva 6: Kasvainalueen CD3+T-lymfosyyttien (a) ja CD8+T-lymfosyyttien (b) määrä eri PD-L1-luokissa. Kuvaaja esittää eri PD-L1-luokkien näytteiden solumäärät (lkm/mm²) siten, että laatikko on keskimmäiset 50 % ja janat osoittavat minimi- ja maksimiarvon; pieni laatikko on keskiarvo ja poikkiviiva mediaani.

PD-L1-positiivisuuden ja kasvaimen reuna-alueen lymfosyyttien määrän välillä näytti olevan positiivinen yhteys, vaikka lymfosyyttien lukumäärän vaihtelu eri PD-L1-luokissa oli suurta. Kasvaimen reuna-alueen CD3+T-lymfosyyttien määrän mediaani oli suurin PD-L1-luokassa >50 % (2590 solua/mm²), toiseksi suurin luokassa 1–50 % (1202 solua/mm²) ja pienin luokassa <1 % (953 solua/mm²) (Kuva 7a). Kasvaimen reuna-alueen CD8+T-lymfosyyttejä oli enemmän PD-L1-positiivisissa kasvainnäytteissä verrattuna PD-L1-negatiivisiin: CD8+T-lymfosyyttien määrän mediaani oli suurin PD-L1-luokassa >50 % (2210 solua/mm²), toiseksi suurin luokassa 1–50 % (1049 solua/mm²) ja pienin luokassa <1 % (105 solua/mm²) (Kuva 7b).



Kuva 7: Kasvaimen reuna-alueen CD3+T-lymfosyyttien (a) ja CD8+T-lymfosyyttien (b) määrä eri PD-L1-luokissa. Kuvaaja esittää eri PD-L1-luokkien näytteiden solumää-
rät (lkm/mm²) siten, että laatikko on keskimmäiset 50% ja janat osoittavat minimi- ja maksimiarvon; pieni laatikko on keskiarvo ja poikkiviiva mediaani.

3.4 T-lymfosyyttien määrä, PD-1- ja PD-L1-positiivisuus sekä hoitovaste

Kasvainnäytteiden lymfositipisteluokkaa ja niiden kasvainsolujen PD-L1-positiivisuutta verrattiin mahdolliseen tietoon hoitovasteesta (Taulukko 4). Kuudesta potilaasta, jotka olivat hyötäneet immunoterapiasta, viiden kasvainnäytteet olivat PD-L1-positiivisia (PD-L1-% >1), ja heistä kolmella kasvainnäytteen PD-L1-positiivisuus oli >50 %. Näistä kaikki olivat saaneet myös vähintään kaksi lymfositipistettä. Yhdellä immunoterapiasta hyötäneellä oli kasvainnäytteessä muita vähemmän lymfosittejä sekä kasvainalueella että kasvaimen reuna-alueella ja PD-L1-negatiivinen kasvainnäyte. Niistä neljästä potilaasta, jotka eivät olleet hyötäneet immunoterapiasta, kolmella kasvainnäytteen PD-L1-positiivisuus oli <1 % ja yhden 1–50 %. Näistä kaikki olivat saaneet korkeintaan kaksi lymfositipistettä.

Myös kasvainnäytteiden lymfositien PD-1-positiivisuutta ja niiden kasvainsolujen PD-L1-positiivisuutta verrattiin hoitovastetietoon (Taulukko 5). Viidestä immunoterapiasta hyötäneestä potilaasta, joilla oli anti-PD-1 vasta-aineella värjätty kasvainnäyte, kaikkien kasvainnäytteet kuuluivat PD-1-luokkaan (+) tai (++). Heistä kahden kasvainnäyte oli >50 % PD-L1-positiivinen, kahden 1–50 % PD-L1-positiivinen ja yhden <1 % PD-L1-positiivinen. Neljästä potilaasta, jotka eivät olleet hyötäneet immunoterapiasta, yhden kasvainnäyte oli sekä PD-1- että PD-L1-negatiivinen, kahden kasvainnäyte kuului PD-1-luokkaan (+) ja oli PD-L1-negatiivinen ja yhden kasvainnäyte kuului PD-1-luokkaan (++) ja oli 1–50 % PD-L1-positiivinen.

Taulukko 4: Kasvainnäytteet ryhmiteltynä lymfosyyttipisteiden ja PD-L1-positiivisuuden suhteen sekä mahdollinen tieto hoitovasteesta.

LYMFOSYYTTI- PISTEET	PD-L1-%	N	HYVÄ HOITO- VASTE (lkm)	HUONO HOITO- VASTE (lkm)
0-1	<1	4	1	1
	1-50	2		1
	>50	2		
2	<1	2		2
	1-50	3	2	
	>50	0		
3-4	<1	1		
	1-50	1		
	>50	3	3	

Taulukko 5: Kasvainnäytteet ryhmiteltynä PD-1-positiivisuuden ja PD-L1-positiivisuuden suhteen sekä mahdollinen tieto hoitovasteesta.

PD-1	PD-L1-%	N	HYVÄ HOITO- VASTE (lkm)	HUONO HOITO- VASTE (lkm)
0	<1	1		1
	1-50	0		
	>50	1		
+	<1	6	1	2
	1-50	0		
	>50	2	1	
++	<1	0		
	1-50	6	2	1
	>50	1	1	

4 TULOSTEN TARKASTELU JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Yksilöllistetty lääketiede on lähestymistapa, jossa pyritään tehostamaan tautien ennaltaehkäisyä sekä diagnosointi- ja hoitomenetelmiä ottamalla yksilön ominaispiirteet huomioon (Collins ja Varmus 2015). Koska syövän hoidossa käytetty anti-PD-1 immunoterapia tehoaa vain osalla potilaista, on kallista ja siihen liittyy haittavaikutusten riski, kannattaa sen käytössä soveltaa yksilöllistetyn lääketieteen periaatetta (Masucci ym. 2016). Anti-PD-1 immunoterapia estää T-lymfosyyttien inhibitorisen PD-1 reseptorin toimintaa ja pyrkii palauttamaan niiden kyvyn tuhota syöpäsoluja (Wang ym. 2014, Patnaik ym. 2015). T-lymfosyyttien kyky tuhota syöpäsoluja riippuu mahdollisten olemassa olevien inhiboivien mekanismien lisäksi myös siitä, millaisen immuunivasteen kasvain on alunperin aiheuttanut (Guermontprez ym. 2002, Chen ja Mellman 2013). Potilaan ominaispiirteet, jotka ennustavat anti-PD-1 immunoterapian tehoa liittyvät siis todennäköisesti sekä hänen kasvaimensa että immuunijärjestelmänsä ominaisuuksiin (Kourea ja Kotoula 2016).

Yksi kasvaimen ja immuunijärjestelmän välisestä vuorovaikutuksesta kertova tekijä on kasvainalueen T-lymfosyytti-infiltraatio. Tutkimuksessani oli näytteitä useista eri kasvaintaudeista, muun muassa melanoomasta, munuaisen kirkassolukarsinoomasta, Hodgkinin lymfoomasta ja rinnan adenokarsinoomasta, ja ne oli otettu ennen anti-PD-1 immunoterapian aloitusta. Kaikissa näytteissä oli kasvainalueella sekä CD3- että CD8-positiivisia T-lymfosyyttejä, mutta lymfosyyttien lukumäärä vaihteli kymmenistä soluista tuhansiin neliömillimetrillä eri näytteiden välillä. Kasvaimen T-lymfosyytti-infiltraation voimakkuus voi mahdollisesti olla prognostinen tekijä, esimerkiksi joissakin rintasyöpätyypeissä runsas kasvaimen lymfosyytti-infiltraatio ja erityisesti korkea CD8+T-lymfosyyttien määrä on yhdistetty pidempään elossaoloaikaan ennen taudin etenemistä (Burugu ym. 2017). Metastaattisessa melanoomassa runsas kasvaimen lymfosyytti-infiltraatio ennusti pidempää elossaoloaikaa (Kluger ym. 2015), kuten myös useissa muissa kasvaintaudeissa (Fridman ym. 2012). Toisaalta, joissakin tutkimuksissa CD8+T-lymfosyytti-infiltraatio kasvaimessa on yhdistetty huonoon ennusteeseen, esimerkiksi munuaisen kirkassolukarsinoomassa (Giraldo ym. 2015). T-lymfosyyttien läsnäolo kasvaimessa ei takaa, että käynnissä olisi aktiivinen kasvaimenvastainen immuunireaktio, sillä T-lymfosyytit saattavat olla uupuneita raskaan antigeenitaakan alla tai kasvainsolujen aktiivisesti inhiboimia (Apetoh ym. 2015). Anti-PD-1-terapialla voidaan yrittää tehostaa ja vapauttaa aiemmin käynnistynyttä kasvaimenvastaista immuunivastetta (Tumeh ym. 2014). Näin ollen runsas T-lymfosyytti-infiltraatio voi kertoa immunologisesti aktivoituneesta,

mutta kasvaimen suppressoimasta kasvainmikroympäristöstä, joka on edellytys anti-PD-1-immunoterapian tehoamiselle (Becht ym. 2016). Esimerkiksi metastaattista melanoomaa sairastavista potilaista anti-PD-1 immunoterapiasta hyötäneillä oli hoitoon reagoimattomia potilaita runsaammin CD8+T-lymfosyyttejä sekä kasvainalueella että kasvaimen invasiivisessa reunassa (Tumeh ym. 2014). Tutkimuksessani kuudesta hyvän hoitovasteen saaneesta potilaasta viidellä oli lymfosyyttirikas kasvainnäyte, jossa joko kasvainalueella, kasvaimen reuna-alueella tai molemmissa oli mediaaniarvoa enemmän sekä CD3+ että CD8+T-lymfosyyttejä. Huonon hoitovasteen saaneilla puolestaan oli näytteissään vaihtelevasti kasvainalueen lymfosyyttejä. Toisaalta, yhdellä immunoterapiasta hyötäneellä oli mediaaniarvoon verrattuna vähän T-lymfosyyttejä sekä kasvainalueella että kasvaimen reuna-alueella. Pelkkä T-lymfosyyttien määrä ei näytä luotettavasti ennustavan anti-PD-1 immunoterapian tehoa yksittäisellä potilaalla. Lisäksi, kun verrataan T-lymfosyyttien kokonaismäärää ennusteeseen tai hoitovasteeseen, on huomioitava että CD3 on T-solureseptorin ko-reseptori, joka ilmentyy kaikkien kypsien T-lymfosyyttien eli CD8+ ja CD4+T-lymfosyyttien lisäksi esimerkiksi Treg-säätelysolujen pinnalla (Luckheeram ym. 2012). Osa CD3+T-lymfosyyteistä on siis todennäköisesti kasvainmikroympäristössä lähtökohtaisesti immuunivastetta vaimentavia.

T-lymfosyyttien laadun lisäksi niiden funktionaalisella tilalla on oleellinen merkitys kasvaimenvastaisen immuunireaktion ja anti-PD-1 immunoterapiavasteen kannalta. Eräs lymfosyyttien funktionaalisesta tilasta mahdollisesti kertova tekijä on niiden PD-1 ekspressio. Normaalisti inhibitorinen PD-1 reseptori ilmentyy aktivoituneiden T- ja B-lymfosyyttien pinnalla ja sen tarkoitus on estää autoimmuunireaktioita sekä ylimääräistä kudostuhhoa immuunivasteen aikana (Topalian ym. 2015a, Simon ja Labarriere 2018). CD8+T-lymfosyyttien PD-1 ekspressio kertoo siis ensisijaisesti niiden aktivaatiosta (Simon ja Labarriere 2018). Kasvaimen aiheuttama krooninen antigeenistimulaatio voi kuitenkin aiheuttaa CD8+T-lymfosyyttien pysyvää PD-1 ekspressiota ja solujen uupumista. PD-1 ilmentymisen perusteella ei näin ollen voi varmuudella erottaa toimivia CD8+T-lymfosyyttejä toimimattomista. Toisaalta, follikulaarisessa lymfoomassa on havaittu että kasvaimen lymfosyyttien PD-1 ekspressio voi olla joko voimakasta tai heikkoa: voimakkaasti PD-1:tä ekspressoivat follikulaariset CD4+T-auttajasolut ja heikosti uupuneet CD4+ ja CD8+T-lymfosyytit (Yang ym. 2015). Tutkimuksessa ei löydetty lainkaan vahvasti PD-1:tä ekspressoivia CD8+T-lymfosyyttejä. Tutkimukseni kasvainnäytteistä suurimmassa osassa oli PD-1-positiivisia T-lymfosyyttejä ja vain kaksi näytteistä oli PD-1-negatiivisia. Lisäksi näytteissä, jotka olivat selvästi PD-1-positiivisia (++), oli yleisesti nähtävissä sekä heikosti että voimakkaasti PD-1:tä ekspressoivia soluja. Jos intensiteetiltään

erilainen PD-1 ekspresio viittaa funktionaalisesti erilaisiin lymfosyytteihin, esimerkiksi heikko PD-1-positiivisuus uupuneisiin CD4+ ja CD8+T-lymfosyytteihin, näyttäisivät nämä selvästi PD-1-positiiviset kasvainnäytteet olevan immunologisesti aktiivisia. Follikulaarisessa lymfoomassa suuri määrä heikosti PD-1-positiivisia CD4+ ja CD8+T-lymfosyytteja liittyi huonoon ennusteeseen (Yang ym. 2015). Pään- ja kaulanalueen syövässä suuri määrä PD-1-positiivisia kasvaimen CD8+T-lymfosyytteja liittyi potilaan lyhyempään elossaoloaikaan ennen taudin etenemistä (Kansy ym. 2017). Nenänielun karsinoomassa ei löydetty yhteyttä kasvaimen lymfosyyttien PD-1-positiivisuuden ja elossaoloajan tai elossaoloajan ennen taudin etenemistä välillä (Zhou ym. 2017). Tutkimukseni kaikilla anti-PD-1 immunoterapiasta hyötäneillä potilailla oli PD-1-positiivinen kasvainnäyte. Huonon hoitovasteen saaneilla oli näytteissään vaihtelevasti PD-1-positiivisia lymfosyytteja.

PD-1-välitteisen T-lymfosyytti-inhibition käynnistävät reseptoriin sitoutuvat ligandit PD-L1 ja PD-L2, joita kudoksessa ekspressoivat normaalisti muun muassa aktivoituneet hematopoieettiset solut ja epiteelisolut (Topalian ym. 2015a). Lisäksi osa kasvainsoluista ilmentää PD-L1:tä. PD-L1 ekspresio on kasvainsoluissa useimmiten induoituvaa eli vaste aktiivisten CD8+T-lymfosyyttien erittämälle interferoni- γ :lle (Ribas ja Hu-Lieskovan 2016). Indusoituva PD-L1 ekspresio kertoo siten adaptiivisesta immuuniresistenssistä. Useissa tutkimuksissa PD-L1-positiivisuus on liitetty runsaaseen lymfosyytti-infiltraatioon, mm. rintasyövässä (Schalper ym. 2014, Kitano ym. 2017) ja metastaattisessa melanoomassa (Kluger ym. 2015). Tutkimukseni kasvainnäytteistä suurin osa (11/18) ekspresoi PD-L1:tä ja kaikki PD-L1-positiiviset kasvaimet sisälsivät lymfosyytteja. Kuitenkin ainoastaan kasvaimen reuna-alueen CD8-positiivisten lymfosyyttien määrä oli selvästi suurempi PD-L1-positiivisilla kuin negatiivisilla näytteillä. Kasvainsolujen PD-L1 ekspresio oli assosioitunut merkitsevästi lymfosyyttien PD-1 ekspresion kanssa rintasyövässä (Brockhoff ym. 2018) sekä useissa eri kiinteissä kasvaimissa (Taube ym. 2014). Kaikki tutkimukseni näytteet, jotka olivat selvästi PD-1-positiivisia (++) olivat myös PD-L1-positiivisia. Toisaalta yksi >50 % PD-L1-positiivinen näyte oli PD-1-negatiivinen. PD-L1-positiivisuus voikin olla kasvainsoluissa myös pysyvää, jolloin se on seurausta muutoksista kasvainsolujen geneisissä tai niiden säätelyssä (Ribas ja Hu-Lieskovan 2016). PD-L1 ekspresion on huomattu joissakin tutkimuksissa olevan prognostinen tekijä. Metastaattisessa melanoomassa ja rintasyövässä PD-L1 ekspresio liittyi pidempään elossaoloaikaan (Taube ym. 2012, Brockhoff ym. 2018) ja lisäksi rintasyövässä pidempään elossaoloaikaan ennen taudin etenemistä (Schalper ym. 2014, Brockhoff ym. 2018). Ei-pienisoluisessa keuhkasyövässä yhteys PD-L1-positiivisuuden ja elossaoloajan välillä on ollut tutkimuksesta riippuen joko positiivinen tai negatiivinen (Mino-Kenudson 2016).

Kasvainsolujen PD-L1 ekspressio on monissa syöpätaudeissa yhdistetty hyvään anti-PD-1 immunoterapiahoitovasteeseen, esimerkiksi melanoomassa, ei-pienisoluisessa keuhkosyövässä, munuaissolukarsinoomassa, kolorektaalikarsinoomassa ja eturauhassyövässä (Taube ym. 2014). Samankaltaisesti tutkimuksessani niistä kuudesta potilaasta, jotka olivat hyötynet immunoterapiasta, viiden kasvainnäytteet olivat PD-L1-positiivisia, ja heistä kolmella PD-L1-positiivisuus oli yli 50 %. Huonon hoitovasteen saaneista potilaista kolmella neljästä oli kasvainnäytteen PD-L1-positiivisuus <1 % ja yhdellä 1-3 %. Toisaalta yhden anti-PD-1 immunoterapiasta hyötynet potilaan kasvainnäyte oli PD-L1-negatiivinen.

Yksittäisistä tekijöistä erityisesti kasvainsolujen PD-L1-positiivisuus on todettu tärkeäksi potentiaaliseksi predikttiiviseksi biomarkkeriksi, koska useissa tutkimuksissa sen on todettu korreloivan hyvän anti-PD-1 immunoterapiahoitovasteen kanssa (Spencer ym. 2016). Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto FDA onkin hyväksynyt diagnostisia immunohistokemiallisia PD-L1 analyyseja käytettäväksi yhdessä tiettyjen anti-PD-1 lääkkeiden kanssa (FDA 2018). Valitettavasti vaikka PD-L1 ekspressio joissakin syöpätaudeissa näyttää ennustavan hyvää hoitovastetta, PD-L1 ekspressiolla on sekä matala negatiivinen että matala positiivinen predikttiivinen arvo (Masucci ym. 2016). Ei siten voida ennustaa, että potilas jolla on PD-L1:tä ekspressoiva kasvain varmuudella hyötynet anti-PD-1-immunoterapiasta (Spencer ym. 2016). Pelkän PD-L1-negatiivisuuden perusteella ei pitäisi myöskään sulkea potilaita immunoterapian ulkopuolelle. PD-L1 ekspression ongelmat biomarkkerina johtuvat sekä biologisista että teknisistä seikoista: PD-L1 ekspressio on kasvaimessa usein heterogeenistä ja dynaamista ja se voi olla erilaista primääri- ja metastaasikasvaimen välillä (Ribas ja Hu-Lieskovan 2016, Spencer ym. 2016). Ja toisaalta pysyvän PD-L1 ekspression kliininen merkitys hoitovasteen kannalta on epäselvä. Kasvainmikroympäristössä on usein lisäksi myös muita immuunijärjestelmää suppressoivia mekanismeja, kuten immuunijärjestelmää vaimentavia soluja sekä mahdollisesti muiden tarkistuspiestemolekyylien ekspressiota (Munn ja Bronte 2016). Tekniset seikat, kuten erilaisten anti-PD-L1 vasta-aineiden käyttö, eriävät käytännöt mukaan laskettavan PD-L1 ekspression laadun ja sijainnin suhteen sekä erilaiset positiivisuuden raja-arvot vaikeuttavat PD-L1 biomarkkeritestien antamien tulosten vertaamista keskenään (Masucci ym. 2016).

Koska kasvaimen ja immuunijärjestelmän välinen vuorovaikutus on monimutkaista ja dynaamista, yksittäisten biomarkkereiden yhdistäminen laajemmiksi paneeleiksi voisi nostaa niiden predikttiivistä arvoa (Masucci ym. 2016, Spencer ym. 2016). Kasvaimet voidaan esimerkiksi yksinkertaisesti luokitella eri tekijöiden, esimerkiksi T-soluinfiltraation ja PD-L1-positiivisuuden perusteella (Teng ym. 2015). Tällaisessa

luokittelussa adaptiivista immuuniresistenssiä indikoi se, että kasvain on sekä PD-L1-positiivinen että lymfosyyttirikas ja pysyvää PD-L1-ekspressiota se, että kasvain on PD-L1-positiivinen, mutta lymfosyyttiköyhä. PD-L1-negatiivisuus yhdistettynä runsaaseen lymfosyytti-infiltraatioon puolestaan kertoo mahdollisten muiden suppressorien läsnäolosta ja PD-L1-negatiivisuus ja lymfosyyttiköyhyys immunologisesti epäaktiivisesta kasvainmikroympäristöstä. Tällainen malli voisi antaa suuntaviivat sopivan hoitomenetelmän valintaan, esimerkiksi monoterapian tai jonkinlaisen yhdistelmähoiton välillä. Tutkimuksessani kasvainnäytteet jaettiin ryhmiin lymfosyyttien määrän ja kasvainsolujen PD-L1-positiivisuuden perusteella sekä toisaalta lymfosyyttien PD-1-positiivisuuden ja kasvainsolujen PD-L1-positiivisuuden perusteella. Hyvän hoitovasteen saaneista kuudesta potilaasta viiden kasvainnäytteessä oli luokittelun perusteella käynnissä adaptiivinen immuuniresistenssi, sillä ne olivat sekä PD-L1-positiivisia että lymfosyyttirikkaita. Yhden hyvän hoitovasteen saaneen potilaan kasvainnäyte oli kuitenkin luokittelun perusteella immunologisesti epäaktiivinen. Näytteen harvoista lymfosyyteistä osa oli kuitenkin PD-1-positiivisia. Jos näytteessä on vain vähän lymfosyyttejä, voi siis olla hyödyllistä tutkia niiden funktionaalista tilaa määrittämällä esimerkiksi PD-1-ekspressio. Toisaalta yhdellä huonon hoitovasteen saaneista potilaista oli vastaavasti lymfosyyttiköyhä, mutta PD-1- ja PD-L1-positiivinen näyte. Kasvaimessa saattaa tällöin olla aktiivisena myös muita immuunijärjestelmää suppressoivia mekanismeja. Yhdessäkään huonon hoitovasteen saaneiden potilaiden kasvainnäytteistä ei ollut käynnissä adaptiivinen immuuniresistenssi, kun luokittelussa otettiin huomioon lymfosyyttien määrä ja PD-L1-positiivisuus. PD-1-positiivisuuden huomioiminen ei tässä tuonut lisäinformaatiota. Kasvainnäytteiden yksinkertainen luokittelu kasvainsolujen PD-L1-positiivisuuden sekä T-lymfosyyttien määrän voi siis olla hyvä lähtökohta anti-PD-1 immunoterapiavastetta ennustavalle predikttiiviselle mallille. Kuitenkaan näin yksinkertaisen mallin antaman tuloksen perusteella ei voisi rajata potilaita anti-PD-1-immunoterapian ulkopuolelle, sillä mallissa on samoja rajoitteita kuin pelkkään PD-L1-määritykseen perustuvassa prediktiossa. Mutaatiotaakan ja siten mahdollisten kasvainantigeenien määrän tutkiminen kasvainkudoksesta voisi tuoda lisäinformaatiota siitä, kuinka vahvan immuunivasteen kasvain voi saada aikaan. Tieto mutaatioiden määrästä toisi siten tärkeän lisäulottuvuuden anti-PD-L1 immunoterapiavastetta ennustavaan predikttiiviseen malliin. Esimerkiksi Goodman ym. (2017) saivat tutkimuksessaan selville, että useissa eri kiinteän kudoksen syöpätaudeissa alunperin korkeamman mutaatiotaakan kasvaimet reagoivat matalan mutaatiotaakan kasvaimia todennäköisemmin anti-PD-L1 immunoterapiaan.

Jotta biomarkkeritesti voidaan hyväksyä kliiniseen käyttöön, sillä tulee olla korkea

analyttinen validiteetti eli sen tulee tarkasti ja luotettavasti mitata tutkittava analyytti potilasnäytteestä (Masucci ym. 2016). Biomarkkeritestin tulee olla lisäksi kliinisesti validi, eli testituloksen tulee korreloida vahvasti ja luotettavasti kliinisen lopputuleman, esimerkiksi hoitovasteen kanssa. Biomarkkeritestillä tulee olla korkea kliininen utiliteetti eli sen käyttöönoton pitää hyödyttää potilaita ja olla parannus aiempiin hoitokäytäntöihin nähden. Testien tulisi toisaalta olla edullisia, helppokäyttöisiä ja hyvin saatavilla olevia (Spencer ym. 2016). Kuitenkin kasvaimen ja immuunijärjestelmän välisen vuorovaikutuksen monimutkaisuuden vuoksi voi olla tarpeen kerätä moniulotteista dataa tutkimalla esimerkiksi kasvaimen mutaatiotaakkaa, T-solureseptoreja, sytokiineja ym. immuunivastetekijöitä sekä immunohistokemiallisia markkereita kasvainmikroympäristössä (Yuan ym. 2016). Moniulotteisen datan käsittely vaatii puolestaan tietokoneavusteisia metodeja matemaattisten mallien luomiseksi. Tekniset haasteet ovat ratkaistavissa, mutta lopullista kliinistä utiliteettia saattaa kuitenkin yhä rajoittaa luonnollinen biologinen variaatio (Dobbin ym. 2016).

Anti-PD-1 immunoterapia on yksi lupaavimmista syövän hoitomuodoista, mutta hoitovasteelle prediktiivisten biomarkkeritestien kehittämistä ja käyttöönottoa rajoittavat useat tekniset sekä biologiset seikat. Tämän tutkimuksen tarkoitus oli retrospektiivisesti määrittää Keski-Suomen keskussairaalassa ennen kesää 2017 anti-PD-1 immunoterapialla hoidettujen syöpäpotilaiden kasvainnäytteiden immunologinen tila ja etsiä korrelaatiota sen ja hoitovasteen välillä. Aineiston rajoitteista huolimatta tutkimukseni tulokset tukevat aiempia havaintoja siitä, että anti-PD-1-immunoterapia tehoaa useammin potilailla, joiden kasvaimessa on käynnissä adaptiivinen immuuniresistenssi kuin potilailla, joilla on vaatimaton kasvaimen lymfosyytti-infiltraatio ja PD-L1-negatiiviset kasvainsolut. Tutkimuksessani tulee ilmi myös kasvainmikroympäristön tilaa määrittävän immunohistokemiallisen anti-PD-1 immunoterapiahoitovasteelle prediktiivisen biomarkkeritestin kehittämiseen liittyvä ongelma: kasvaimen lymfosyytti-infiltraatio, lymfosyyttien PD-1-positiivisuus tai kasvainsolujen PD-L1-positiivisuus eivät yksittäisinä tekijöinä tai yhdistelmänä kykene luotettavasti erottamaan huonon ja hyvän hoitovasteen saaneiden potilaiden kasvainnäytteitä toisistaan.

KIITOKSET

Haluan kiittää ohjaajiani LT Juha Konosta mahdollisuudesta tutustua syövän immunologian kiehtovaan maailmaan ja FT Nina Rintasta kaikesta avusta ja tuesta työn eri vaiheissa. Lisäksi haluan kiittää LT Teijo Kuopiota, FT Maarit Ahtiaista ja FT Mari Saarinen-Valtaa immunohistokemian ja digitaalisen patologian opettamisesta sekä innostavista keskusteluista. Koko KSSH:n patologian henkilökuntaa haluan kiittää kaikesta avusta, seurasta ja mukavista hetkistä kesällä 2017. FT Janne Ihalaista kiitän neuvoista ja kannustuksesta. Lopuksi kiitän vielä FM Roope Lehtoa korvaamattomasta tietoteknisestä avusta työn kirjoitusvaiheessa.

KIRJALLISUUS

- Agilent 2018. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Interpretation Manual. (luettu: 18.8.2018).
- Angell H. ja Galon J. 2013. From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Current opinion in immunology* 25.2, s. 261–267.
- Apetoh L., Smyth M. J., Drake C. G., Abastado J.-P., Apte R. N., Ayyoub M., Blay J.-Y., Bonneville M., Butterfield L. H., Caignard A. ym. 2015. Consensus nomenclature for CD8+ T cell phenotypes in cancer. *Oncoimmunology* 4.4, e998538. DOI: 10.1080/2162402X.2014.998538.
- Bankhead P., Loughrey M. B., Fernández J. A., Dombrowski Y., McArt D. G., Dunne P. D., McQuaid S., Gray R. T., Murray L. J., Coleman H. G. ym. 2017. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific reports* 7.1, s. 16878. DOI: 10.1038/s41598-017-17204-5.
- Becht E., Giraldo N. A., Dieu-Nosjean M.-C., Sautès-Fridman C. ja Fridman W. H. 2016. Cancer immune contexture and immunotherapy. *Current opinion in immunology* 39, s. 7–13.
- Berghoff A. S., Ricken G., Wilhelm D., Rajky O., Widhalm G., Dieckmann K., Birner P., Bartsch R. ja Preusser M. 2016. Tumor infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in brain metastases of small cell lung cancer (SCLC). *Journal of neuro-oncology* 130.1, s. 19–29.
- Brockhoff G., Seitz S., Weber F., Zeman F., Klinkhammer-Schalke M., Ortmann O. ja Wege A. K. 2018. The presence of PD-1 positive tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancers is associated with a favorable outcome of disease. *Oncotarget* 9.5, s. 6201–6212.

- Burugu S., Asleh-Aburaya K. ja Nielsen T. O. 2017. Immune infiltrates in the breast cancer microenvironment: detection, characterization and clinical implication. *Breast Cancer* 24.1, s. 3–15.
- Chen D. S. ja Mellman I. 2013. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 39.1, s. 1–10.
- Collins F. S. ja Varmus H. 2015. A new initiative on precision medicine. *New England Journal of Medicine* 372.9, s. 793–795.
- Coussens L. M. ja Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420.6917, s. 860–7.
- Couzin-Frankel J. 2013. *Cancer immunotherapy*.
- Dobbin K. K., Cesano A., Alvarez J., Hawtin R., Janetzki S., Kirsch I., Masucci G. V., Robbins P. B., Selvan S. R., Streicher H. Z. ym. 2016. Validation of biomarkers to predict response to immunotherapy in cancer: Volume II—clinical validation and regulatory considerations. *Journal for immunotherapy of cancer* 4.1, s. 77.
- FDA 2018. List of Cleared or Approved Companion Diagnostic Devices (In Vitro and Imaging Tools). (luettu: 18.8.2018).
- Fridman W. H., Pagès F., Sautès-Fridman C. ja Galon J. 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer* 12.4, s. 298–306.
- Gabrilovich D. I., Ostrand-Rosenberg S. ja Bronte V. 2012. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature Reviews Immunology* 12.4, s. 253–68.
- Gajewski T. F., Schreiber H. ja Fu Y.-X. 2013. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature immunology* 14.10, s. 1014.
- Giraldo N. A., Becht E., Pages F., Skliris G., Verkarre V., Vano Y., Mejean A., Saint-Aubert N., Lacroix L., Natario I. ym. 2015. Orchestration and prognostic significance of immune checkpoints in the microenvironment of primary and metastatic renal cell cancer. *Clinical Cancer Research* 21.13, s. 3031–3040.
- Goodman A. M., Kato S., Bazhenova L., Patel S. P., Frampton G. M., Miller V., Stephens P. J., Daniels G. A. ja Kurzrock R. 2017. Tumor mutational burden as an independent predictor of response to immunotherapy in diverse cancers. *Molecular cancer therapeutics*. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0386.
- Guermonprez P., Valladeau J., Zitvogel L., Théry C. ja Amigorena S. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology* 20.1, s. 621–667.
- Hanahan D. ja Weinberg R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell* 144.5, s. 646–674.
- Hayes D. 2016. “Considerations for Implementation of Cancer Molecular Diagnostics Into Clinical Care.” Teoksessa: *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Meeting*. Vol. 35, s. 292–296.

- Kansy B. A., Concha-Benavente F., Srivastava R. M., Jie H.-B., Shayan G., Lei Y., Moskovitz J., Moy J., Li J., Brandau S. ym. 2017. PD-1 status in CD8⁺ T cells associates with survival and anti-PD-1 therapeutic outcomes in head and neck cancer. *Cancer research* 77.22, s. 6353–6364.
- Kitano A., Ono M., Yoshida M., Noguchi E., Shimomura A., Shimoi T., Kodaira M., Yunokawa M., Yonemori K., Shimizu C. ym. 2017. Tumour-infiltrating lymphocytes are correlated with higher expression levels of PD-1 and PD-L1 in early breast cancer. *ESMO open* 2.2, e000150. DOI: 10.1136/esmoopen-2016-000150.
- Kluger H. M., Zito C. R., Barr M. L., Baine M. K., Chiang V. L., Sznol M., Rimm D. L., Chen L. ja Jilaveanu L. B. 2015. Characterization of PD-L1 expression and associated T-cell infiltrates in metastatic melanoma samples from variable anatomic sites. *Clinical Cancer Research* 21.13, s. 3052–3060.
- Kourea H. ja Kotoula V. 2016. Towards tumor immunodiagnostics. *Annals of translational medicine* 4.14. DOI: 10.21037/atm.2016.07.07.
- Luckheeram R. V., Zhou R., Verma A. D. ja Xia B. 2012. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clinical and developmental immunology* 2012. DOI: 10.1155/2012/925135.
- Mahoney K. M. ja Atkins M. B. 2014. Prognostic and predictive markers for the new immunotherapies. *Oncology (Williston Park)* 28.Suppl 3, s. 39–48.
- Masucci G. V., Cesano A., Hawtin R., Janetzki S., Zhang J., Kirsch I., Dobbin K. K., Alvarez J., Robbins P. B., Selvan S. R. ym. 2016. Validation of biomarkers to predict response to immunotherapy in cancer: volume I—pre-analytical and analytical validation. *Journal for immunotherapy of cancer* 4.1, s. 76.
- Mino-Kenudson M. 2016. Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) expression by immunohistochemistry: could it be predictive and/or prognostic in non-small cell lung cancer? *Cancer biology & medicine* 13.2, s. 157.
- Mittal D., Gubin M. M., Schreiber R. D. ja Smyth M. J. 2014. New insights into cancer immunoeediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology* 27, s. 16–25.
- Munn D. H. ja Bronte V. 2016. Immune suppressive mechanisms in the tumor microenvironment. *Current opinion in immunology* 39, s. 1–6.
- Pages F., Galon J., Dieu-Nosjean M., Tartour E., Sautes-Fridman C. ja Fridman W. 2010. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 29.8, s. 1093.
- Palucka A. K. ja Coussens L. M. 2016. The basis of oncoimmunology. *Cell* 164.6, s. 1233–1247.

- Patnaik A., Kang S. P., Rasco D., Papadopoulos K. P., Elassaiss-Schaap J., Beeram M., Drenkler R., Chen C., Smith L. S., Espino G. ym. 2015. Phase I study of pembrolizumab (MK-3475; anti-PD-1 monoclonal antibody) in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research*, s. 4286–93.
- Ribas A. ja Hu-Lieskovan S. 2016. What does PD-L1 positive or negative mean? *Journal of Experimental Medicine*, s. 2835–2840.
- Schalper K. A., Velcheti V., Carvajal D., Wimberly H., Brown J., Pusztai L. ja Rimm D. L. 2014. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. *Clinical Cancer Research* 20.10, s. 2773–2782.
- Sharma P. ja Allison J. P. 2015. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell* 161.2, s. 205–214.
- Simon S. ja Labarriere N. 2018. PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy? *OncoImmunology* 7.1, e1364828. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1364828.
- Sivan A., Corrales L., Hubert N., Williams J. B., Aquino-Michaels K., Earley Z. M., Benyamin F. W., Lei Y. M., Jabri B., Alegre M.-L. ym. 2015. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*, s. 1084–9.
- Spencer K., Wang J., Silk A., Ganesan S., Kaufman H. ja Mehnert J. 2016. “Biomarkers for Immunotherapy: Current Developments and Challenges.” Teoksessa: *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Meeting*. Vol. 35, e493–503.
- Taube J. M., Klein A. P., Brahmer J. R., Xu H., Pan X., Kim J. H., Chen L., Pardoll D. M., Topalian S. L. ja Anders R. A. 2014. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clinical cancer research*, s. 5064–74.
- Taube J. M., Anders R. A., Young G. D., Xu H., Sharma R., McMiller T. L., Chen S., Klein A. P., Pardoll D. M., Topalian S. L. ym. 2012. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Science translational medicine* 4.127, s. 127–37.
- Teng M. W., Ngiow S. F., Ribas A. ja Smyth M. J. 2015. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1. *Cancer research* 75.11, s. 2139–2145.
- Topalian S. L., Drake C. G. ja Pardoll D. M. 2015a. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer cell* 27.4, s. 450–461.
- Topalian S. L., Wolchok J. D., Chan T. A., Mellman I., Palucka K., Banchereau J., Rosenberg S. A. ja Witttrup K. D. 2015b. Immunotherapy: the path to win the war on cancer? *Cell* 161.2, s. 185–186.
- Tumeh P. C., Harview C. L., Yearley J. H., Shintaku I. P., Taylor E. J., Robert L., Chmielowski B., Spasic M., Henry G., Ciobanu V. ym. 2014. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 515.7528, s. 568–71.

- Uribe-Querol E. ja Rosales C. 2015. Neutrophils in cancer: two sides of the same coin. *Journal of immunology research* 2015. DOI: 10.1155/2015/983698.
- Wang C., Thudium K. B., Han M., Wang X.-T., Huang H., Feingersh D., Garcia C., Wu Y., Kuhne M., Srinivasan M. ym. 2014. In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates. *Cancer immunology research* 2.9, s. 846–856.
- Wang M., Zhao J., Zhang L., Wei F., Lian Y., Wu Y., Gong Z., Zhang S., Zhou J., Cao K. ym. 2017. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer* 8.5, s. 761.
- Wherry E. J. 2011. T cell exhaustion. *Nature immunology* 12.6, s. 492–9.
- Yang Z.-Z., Grote D., Ziesmer S., Xiu B., Novak A. J. ja Ansell S. M. 2015. PD-1 expression defines two distinct T-cell sub-populations in follicular lymphoma that differentially impact patient survival. *Blood cancer journal* 5.2, e281. DOI: 10.1038/bcj.2015.1.
- Yuan J., Hegde P. S., Clynes R., Foukas P. G., Harari A., Kleen T. O., Kvistborg P., Maccalli C., Maecker H. T., Page D. B. ym. 2016. Novel technologies and emerging biomarkers for personalized cancer immunotherapy. *Journal for immunotherapy of cancer* 4.1, s. 3.
- Zhou Y., Shi D., Miao J., Wu H., Chen J., Zhou X., Hu D., Zhao C., Deng W. ja Xie C. 2017. PD-L1 predicts poor prognosis for nasopharyngeal carcinoma irrespective of PD-1 and EBV-DNA load. *Scientific reports* 7, s. 43627. DOI: 10.1038/srep43627.

LIITE 1. Kasvainnäytteiden lymfosyyttien PD-1 ekspressio ja kasvainsolujen PD-L1-positiivisuus

Kasvainnäyte	PD-1 ekspressio	PD-L1-%
A	+	>50
B	+	<1
C	+	<1
D	++	1-3
E	++	>50
F	++	14-40
G	0	<1
H	++	3-10
I	++	7-14
J	++	20-29
K	+	<1
L	+	<1
M	++	15-28
N	+	<1
O	+	<1
P	0	>50
Q	+	>50
R	n/a	>50