

Opracowanie systemu immunologiczno-molekularnego profilowania chrzęstniakomięsaków

Słowa kluczowe: chrzęstniakomięsak, immuno-onkologia, profilowanie molekularne.

Chrzęstniakomięsak (ChS, ang. chondrosarcoma) jest drugim co do częstości występowania pierwotnym złośliwym nowotworem kości, należącym do mięsaków kości. ChS obejmują heterogenną grupę o wielu podtypach histologicznych ze zróżnicowaną patomorfologią i rokowaniem. Leczenie pacjentów z rozpoznaniem ChS ogranicza się głównie do resekcji chirurgicznej, a inne opcje terapeutyczne są niedostępne z uwagi na oporność tych nowotworów na chemioterapię i radioterapię. ChS są uważane za guzy o słabej odpowiedzi na immunoterapię, jednak zarówno ich mikrośrodowisko, jak i podłoże molekularne oraz patogeneza są nadal słabo poznane. Celem pracy było opracowanie sposobu klasyfikacji ChS w oparciu o ocenę czynników immunologicznych, zmian genetycznych oraz wyników terapii pacjentów.

Do badania włączono 99 pacjentów ze zdiagnozowanym pierwotnym ChS o różnych podtypach histologicznych (28 G1, 37 G2, 24 G3 i 10 odróżnicowanych ChS). Materiał do badań pochodził z blozków parafinowych. Do analiz immunologicznych wykorzystano barwienia immunohistochemiczne dla 20 markerów, obejmujących m.in. efektorowe limfocyty T, limfocyty B, komórki prezentujące antygen, makrofagi M1/M2, „wyczerpane” limfocyty T, czy ekspresję PD-L1 na komórkach nowotworowych. Oceny nacieków komórek odpornościowych dokonano w centralnym i obwodowym regionie guza z wykorzystaniem mikromacierzy tkankowych. Dodatkowo na podgrupie 53 pacjentów oceniono ekspresję genów związanych z mikrośrodowiskiem guza przy pomocy reakcji qPCR z wykorzystaniem komercyjnego panelu 84 genów (Human Cancer Inflammation & Immunity Crosstalk RT² Profiler PCR Array). W celu analizy profilu molekularnego i obciążenia mutacyjnego guza (TMB, ang. *tumor mutational burden*) przeprowadzono sekwencjonowanie następnej generacji z wykorzystaniem celowanego panelu 409 genów (OncoPrint™ Tumor Mutation Load Assay). Dodatkowo oceniono niestabilność mikrosatelitarną (MSI, ang. *microsatellite instability*) z użyciem Idylla™ MSI Test. Wpływ czynników immunologiczno-molekularnych na przeżycia całkowite pacjentów oceniono przy wykorzystaniu wieloparametrycznego modelu Coxa penalizowanego LASSO.

Analiza immunologiczna wykazała, że zarówno w centralnym, jak i obwodowym regionie guza występuje największy udział komórek HLA-DR+, monocytów/makrofagów

CD14+, makrofagów M1 CD68+ i makrofagów M2 CD163+, a także komórek Gal-9+. Na podstawie markerów immunologicznych wytypowano trzy różne klastry odpowiadające immunofenotypom: „zimnemu”, „gorącemu” i „pośredniemu”. Immunofenotypy różniły się znacząco między podtypami ChS ($p < 0,001$). Udział immunofenotypu „zimnego” malał wraz ze wzrostem stopnia złośliwości histologicznej, w przeciwieństwie do immunofenotypu „gorącego”. Z kolei analiza qPCR wykazała, że w przypadku wszystkich podtypów ChS następował spadek ekspresji genów zaangażowanych w różne procesy immunologiczne np. regulację odpowiedzi nabytej czy produkcję molekularnych mediatorów odpowiedzi immunologicznej. Analiza molekularna wykazała, że mediana TMB dla badanej grupy pacjentów wyniosła 2,35 mut/Mb i w żadnej z badanych próbek nie wykryto MSI. Najczęściej występujące mutacje ($> 10\%$ pacjentów) dotyczyły genów *IDH1/2*, *TP53*, *TAF1* i *RNF213*. Obecność mutacji w genach *IDH1/2* lub *TP53* była związana z ChS o wyższym stopniu złośliwości histologicznej ($FDR < 0,05$). Dodatkowo podtypy o wyższym stopniu złośliwości histologicznej (G2/G3, odróżnicowany) cechowała obecność bardziej złożonych zmian molekularnych. Ponadto wykazano, że szlaki związane z receptorami kinaz tyrozynowych, białkiem p53, czy remodelingiem chromatyny były najczęściej deregulowane w badanej grupie pacjentów. W przypadku pacjentów o „gorącym” immunofenotypie obserwowano generalnie więcej aberracji chromosomowych, również w wyżej wymienionych szlakach molekularnych. W wieloczynnikowej analizie obecność immunofenotypu „gorącego” z większą liczbą nacieków immunologicznych w centralnym regionie guza (HR: 3,3; CI: 1,13-9,8; $p < 0,05$) oraz obecność mutacji w genie *IDH1* (HR: 3,8; CI: 1,75-8,1; $p < 0,001$) były niezależnymi, negatywnymi czynnikami prognostycznymi, podobnie jak podtyp histologiczny, czy wielkość guza.

W pracy wykazano, że w rozwoju ChS istotną rolę odgrywają zarówno czynniki genetyczne, jak i immunologiczne. Deregulacje szlaków związanych z epigenetycznymi modyfikacjami histonów, regulacją cyklu komórkowego i szlakami kinaz mogą odgrywać znaczącą rolę w rozwoju i progresji ChS, podobnie jak mutacje *IDH1*. Mikrośrodowisko ChS zdaje się wykazywać cechy immunosupresji, w której największą rolę mogą odrywać makrofagi naciekające guz oraz markery związane z „wyczerpaniem” limfocytów np. ekspresja Gal-9. Przedstawione wyniki sugerują, że zastosowanie skojarzenia immunoterapii z inhibitorami IDH1 może przynieść potencjalne korzyści kliniczne dla wybranych pacjentów.