

Streszczenie rozprawy doktorskiej mgr Anny Glajcar pt.: „*The evaluation of tumor microenvironment in distinct breast cancer molecular subtypes*”

Mikrośrodowisko nowotworowe stanowią elementy bezpośrednio otaczające guz nowotworowy, takie jak: fibroblasty, macierz komórkowa oraz komórki stanu zapalnego. Różnorodność populacji komórek odpowiedzi immunologicznej oraz substancji przez nie wydzielanych przekłada się na ich zdolność do niszczenia komórek nowotworowych lub - przeciwnie - wywoływania zjawiska tolerancji immunologicznej. Uważa się, że wpływ na przebieg choroby nowotworowej mają zarówno komórki odpowiedzi swoistej – limfocyty B i T (oraz ich subpopulacje – limfocyty regulatorowe, cytotoksyczne i pomocnicze) – jak i komórki odpowiedzi nieswoistej, takie jak mastocyty czy komórki NK. Jednocześnie substancje wydzielane przez komórki guza nowotworowego mogą wpływać na aktywność, fenotyp, oraz rekrutację do mikrośrodowiska poszczególnych populacji komórek zapalnych. W rezultacie skład ilościowy oraz jakościowy mikrośrodowiska nowotworowego może zarówno hamować rozwój choroby nowotworowej, jak i przyczyniać się do jej progresji.

Obecnie inwazyjny rak piersi postrzegany jest jako heterogenna grupa guzów, które wywodzą się z nowotworowo przekształconych komórek nabłonkowych wyściełających końcowe fragmenty gruczołu sutkowego (przewodników i zrazików). Poszczególne podtypy raka piersi różnią się wzorami mutacji genetycznych, a zmiany te mają swoje odzwierciedlenie w różnych fenotypach złośliwych guzów piersi. Zgodnie z zaleceniami z St. Gallen, podtypy molekularne określa się na podstawie ekspresji czterech markerów białkowych: receptora estrogenowego (ER), progesteronowego (PR), oraz receptora naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER2), a także białka Ki67, które jest markerem intensywności proliferacji komórek nowotworowych. Poszczególne fenotypy złośliwych guzów sutka charakteryzują się różną agresywnością kliniczną - raki piersi wykazujące ekspresję ER i/lub PR (luminalne) cechują się wolniejszym tempem wzrostu i mniejszą skłonnością do nawrotów i tworzenia przerzutów, podczas gdy nadekspresja HER2, wyższa ekspresja Ki67, brak ekspresji ER/PR (podtyp Nieluminalny), a także fenotyp ER/PR/HER2-ujemny (*triple-negative breast cancer*, TNBC) stanowią niekorzystne czynniki rokownicze dla przebiegu choroby.

Dotychczas zaobserwowano, że podtypy molekularne raka piersi różnią między sobą gęstością nacieku jednojądrzastych komórek zapalnych. Jednocześnie zależności pomiędzy występowaniem poszczególnych populacji komórek zapalnych w mikrośrodowisku

nowotworowym a podtypem molekularnym inwazyjnego raka piersi nie zostały jednoznacznie określone.

Cel pracy

Celem niniejszej pracy było określenie różnic w gęstości nacieku wybranych populacji komórek stanu zapalnego (mastocytów chymazo- i tryptazo-dodatnich, limfocytów T i B, komórek NK, komórek cytotoksycznych, regulatorowych i limfocytów pomocniczych Th2) w pierwotnych inwazyjnych guzach piersi w zależności od:

- podtypu molekularnego inwazyjnego raka piersi (określonego na podstawie klasyfikacji z St. Gallen);
- ekspresji markerów białkowych o znaczeniu prognostycznym i predykcyjnym w raku piersi, takich jak ER, PR, HER2, Ki67;
- występowania innych czynników rokowniczych w raku piersi (wielkość guza, stopień zajęcia węzłów chłonnych, stopień złośliwości histologicznej, podtyp histologiczny guza).

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na archiwalnym materiale tkankowym przechowywanym w Katedrze Patomorfologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. W pierwszej i drugiej pracy materiał stanowiło 108, zaś w trzeciej pracy 106 wycinków tkankowych zdiagnozowanych jako pierwotny inwazyjny rak piersi. Kryterium wykluczenia stanowiło przedoperacyjne zastosowanie leczenia systemowego. Podtyp molekularny raka piersi ustalono w oparciu o klasyfikację z St. Gallen (w pierwszej pracy przyjęto klasyfikację z 2013 roku, w dwóch kolejnych pracach zastosowano klasyfikację z 2015 roku). Po standardowym utrwaleniu i zatopieniu materiału tkankowego, z bloczków parafinowych przygotowane zostały skrawki o grubości 4 μm , które następnie zostały wybarwione immunohistochemicznie w kierunku ekspresji chymazy, tryptazy, CD45RO, CD20, CD56, CD8, FOXP3 oraz GATA3 celem identyfikacji analizowanych populacji komórek nacieku zapalnego. Odczyny immunohistochemiczne wykonano metodą manualną, stosowaną rutynowo w Katedrze Patomorfologii. Gęstość nacieku pozytywnie wybarwionych komórek oceniono w mikroskopie świetlnym. Liczebność mastocytów, komórek NK, cytotoksycznych i regulatorowych wyrażono jako sumę liczb pozytywnie wybarwionych komórek uzyskanych z 5 pól widzenia o powiększeniu 400x (co odpowiadało 1 mm^2 tkanki), zarówno w obrębie nowotworowo zmienionego nabłonka jak i w bezpośrednio otaczającej go tkance. W tych

samych lokalizacjach oceniono odsetek tkanki zajętej przez limfocyty T i B, na podstawie średniej z 5 pól widzenia o powiększeniu 100x. Dodatkowo, dla komórek cytotoksycznych, regulatorowych i Th2 oszacowano ich procent w otaczającym guz nacieku komórek jednojądrzastych, na podstawie średniej wartości otrzymanej z 5 pól widzenia o powiększeniu 400x. Otrzymane wyniki odniesiono do danych patologiczno-klinicznych, a całość poddano analizie statystycznej przy użyciu programu Statistica.

Wyniki i wnioski

Zaobserwowano różnice w gęstości nacieku analizowanych komórek w zależności od podtypu molekularnego raka piersi. Dla mastocytów tryptazo- i chymazo-dodatnich analiza post-hoc wykazała istotnie gęstszy naciek tych komórek zlokalizowanych wewnątrz guzów o fenotypie luminalnym A i B, w porównaniu z nowotworami HER2-dodatnimi nieluminalnymi potrójnie ujemnymi (TNBC). Odwrotne zależności zaobserwowano dla komórek limfoidalnych; spośród wszystkich podtypów nowotwory luminalne A charakteryzowały się naciekiem limfocytów T o najmniejszej intensywności, zarówno wewnątrz guza (istotna różnica w porównaniu z nowotworami TNBC) jak i na jego krawędzi (istotne różnice wykazano w porównaniu z guzami TNBC, HER2-dodatnimi nieluminalnymi i luminalnymi B z nadekspresją HER2). Analiza post-hoc wykazała także istotnie mniej gęsty naciek limfocytów B występujących na krawędzi zmian luminalnych A w porównaniu do raków TNBC i HER2+ nieluminalnych. Podobnie, fenotyp luminalny A oraz B był związany z mniejszą gęstością komórek NK zlokalizowanych na pograniczu guza w porównaniu z nowotworami TNBC. Obserwowana liczebność komórek cytotoksycznych i regulatorowych na krawędzi guza była istotnie wyższa w podtypach HER2-dodatnich nieluminalnych i TNBC niż w guzach luminalnych A; druga z poddanych zależności dla komórek regulatorowych była obserwowana także wewnątrz zmiany nowotworowej. Dodatkowo, gęstość nacieku komórek regulatorowych na krawędzi zmiany różniła się pomiędzy podtypami luminalnymi A i B, z ich większą liczebnością w zmianach drugiego typu. Większą wartość proporcji procentowych udziałów w nacieku komórek regulatorowych/Th2 zaobserwowano w guzach HER2-dodatnich nieluminalnych w porównaniu z guzami luminalnymi A.

Zależności pomiędzy zwiększoną gęstością nacieku a występowaniem nadekspresji HER2 zaobserwowano wyłącznie na krawędzi guza dla limfocytów T, limfocytów B, komórek regulatorowych i cytotoksycznych. Odwrotną zależność, również dookoła zmiany nowotworowej, wykazano dla mastocytów chymazo- i tryptazo-dodatnich.

Wykazano dodatnią korelację pomiędzy ekspresją ER i PR a liczebnością mastocytów chymazo- i tryptazo-dodatnich, oraz odsetkiem w nacieku komórek Th2 i stosunkiem odsetków komórek cytotoksycznych/Th2; ujemną korelację wykazano dla gęstości nacieku limfocytów T, limfocytów B, komórek NK, komórek cytotoksycznych, komórek regulatorowych (zarówno dla liczebności jak i odsetka komórek w nacieku) i stosunku procentowego udziału komórek regulatorowych/Th2. W odniesieniu do indeksu proliferacyjnego guza, zaobserwowano odwrotną zależność pomiędzy ekspresją białka Ki67 w komórkach nowotworowych a liczebnością mastocytów chymazo- i tryptazo-dodatnich, zaś dodatnią korelację zaobserwowano dla gęstości nacieku limfocytów T i B, komórek NK, komórek cytotoksycznych, regulatorowych (zarówno w liczbie jak i w odsetku komórek w nacieku) oraz stosunku procentowego udziału komórek regulatorowych/Th2.

Zaobserwowano zależność pomiędzy wyższym stopniem złośliwości histologicznej raka piersi a mniejszą liczebnością mastocytów tryptazo-dodatnich i zlokalizowanych wewnątrz guza mastocytów chymazo-dodatnich, a także bardziej intensywnym naciekiem limfocytów T i B, większą liczebnością komórek NK na krawędzi guza, większą liczebnością komórek cytotoksycznych i regulatorowych, zwiększonym odsetkiem komórek regulatorowych w otaczającym guz nacieku i wyższym stosunkiem odsetków komórek regulatorowych/ Th2.

Inwazyjne guzy piersi o średnicy większej niż 2 cm ($pT>1$) charakteryzowały się mniejszą liczebnością mastocytów tryptazo-dodatnich, a także gęstszym naciekiem limfocytów T, zlokalizowanych wewnątrz zmiany nowotworowej komórek cytotoksycznych i wyższym stosunkiem procentowego udziału komórek regulatorowych/Th2 w otaczającym guz nacieku zapalnym. Dodatkowo, w guzach luminalnych, wykazano zależność pomiędzy większym rozmiarem guza a gęstszym naciekiem komórek cytotoksycznych i regulatorowych wewnątrz guza, zwiększonym odsetkiem komórek regulatorowych w otaczającym nacieku oraz zwiększonym stosunkiem odsetków komórek regulatorowych/ Th2.

Wykazano zależność pomiędzy występowaniem przerzutów raka piersi w węzłach chłonnych a zwiększonym odsetkiem komórek regulatorowych oraz stosunkiem odsetków komórek regulatorowych/ Th2 w otaczającym guz podścielisku. W grupie raków nieluminalnych zaobserwowano wyższą wartość wskaźnika liczby komórek cytotoksycznych/regulatorowych wewnątrz przerzutujących guzów.

W odniesieniu do typu histologicznego raka piersi, zmiany zakwalifikowane jako *no-otherwise specified* (NOS) cechowały się mniejszą liczebnością mastocytów tryptazo-dodatnich w obrębie nowotworowo zmienionego nabłonka, bardziej intensywnym naciekiem

limfocytów T, limfocytów B, komórek cytotoksycznych i regulatorowych dookoła zmiany (zarówno pod względem ich liczby jak i odsetka w nacieku zapalnym), oraz zmniejszonym stosunkiem liczby komórek cytotoksycznych/ regulatorowych wewnątrz guza w porównaniu do guzów o morfologii zrazikowej.

Uzyskane wyniki wskazują na istnienie różnic w składzie mikrośrodowiska nowotworowego w zależności od podtypu molekularnego inwazyjnego raka piersi oraz występowania pozostałych czynników prognostycznych i predykcyjnych w tej chorobie.

- Różnice w nacieku poszczególnych komórek zapalnych oraz korelacje z ekspresją ER, PR i Ki67 wskazują na związek mastocytów z występowaniem podtypów raka piersi o łagodniejszym przebiegu klinicznym, podczas gdy bardziej obfity naciek komórek limfoidalnych i zwiększony stosunek odsetków komórek regulatorowych/ Th2 związane są z występowaniem podtypów cechujących się agresywnym przebiegiem choroby;
- Różnice w nacieku analizowanych komórek wskazują na związek mastocytów z występowaniem korzystnych czynników rokowniczych, takie jak mniejszy rozmiar guza, niższy stopień złośliwości histologicznej; odwrotna zależność obserwowana jest dla nacieku komórek limfoidalnych, cytotoksycznych i regulatorowych;
- Odmiennie zależności obserwowane dla populacji komórek zapalnych zlokalizowanych wewnątrz guza lub na jego krawędzi wskazują na odmienną rolę tych komórek w patogenezie raka piersi w zależności od lokalizacji w tkance;
- Różnice w gęstości poszczególnych subpopulacji limfocytów T obserwowane pomiędzy luminalnymi i noluminalnymi inwazyjnymi guzami piersi o różnym stopniu zaawansowania klinicznego choroby (rozmiar guza, zajęcie węzłów chłonnych) wskazują na odmienną rolę komórek stanu zapalnego w procesie progresji nowotworowej, w zależności od podtypu molekularnego raka piersi.

Summary

Tumor microenvironment is made up of elements located in an immediate surrounding of a malignant tumor, such as: fibroblasts, stroma and cells of the immune system. The diversity of the immune cell populations and their mediators manifests in immune cell ability to kill cancer cells or, conversely, contributes to immunotolerance. It is accepted that cells of both the adaptive response – B-lymphocytes, T-cells (as well as their subpopulations – regulatory, cytotoxic and helper cells) - and the innate response (e.g. mast cells and NK cells) affect the course of cancer disease. In parallel, molecules secreted by cancer cells may impact on activity and phenotype of respective immune cell populations, as well as on their recruitment to the microenvironment. Consequently, composition of tumor microenvironment (in its quantitative and qualitative terms) is presumed to either inhibit or promote tumor progression.

The term ‘invasive breast cancer’ is currently related to heterogenous group of tumors, which derive from transformed epithelial cells that line terminal parts of mammary gland (ducts and lobules). Respective types of breast cancer tumors differ in their mutational pattern, which are reflected in a diversity of phenotypes observed in invasive breast cancers. In accordance with St Gallen recommendations, molecular subtypes are determined by expression of four protein markers: estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epithelial growth factor receptor 2 (HER2), as well as Ki67 protein, which indicates intensiveness of cancer cell proliferation. Respective phenotypes of invasive breast lesions are characterized by distinct clinical aggressiveness – breast tumors that express ER and/or PR (luminal tumors) show lower growth rate and lower metastatic potential, while overexpression of HER2, higher expression of Ki67, ER/PR-negativity (non-luminal type) and ER/PR/HER2-negative phenotype (triple-negative breast cancer, TNBC) are adverse prognostic factors in breast cancer.

To date, it has been observed that breast cancer molecular subtypes differ in a density of mononuclear cell infiltrate. However, relationships between the infiltrate of immune cell populations in tumor microenvironment and molecular subtypes of invasive breast cancer have not been fully elucidated yet.

Objectives

This study aimed to determine the differences in densities of selected immune cell populations (chymase- and tryptase-positive mast cells, T lymphocytes, B lymphocytes, NK cells, cytotoxic cells, regulatory cells and T-helper 2 cells) in primary invasive breast cancers, with regard to:

- a molecular subtype of invasive breast cancer (identified in accordance with St Gallen classification);
- an expression of protein markers with prognostic and predictive significance in breast cancer, such as ER, PR, HER2 and Ki67;
- the occurrence of other prognostic indicators in breast cancer (tumor size, lymph node involvement, histologic grade, histologic type).

Materials and Methods

The study was carried out on archival tissue samples collected from the Department of Pathomorphology (Jagiellonian University Medical College, Cracow). In the first two articles material consisted of 108 excisions diagnosed as primary invasive breast cancer. In the third paper 106 tissue samples were investigated. The implementation of pre-surgical systemic therapy was regarded as an exclusion factor in the study. The molecular subtype of breast cancer was determined in accordance with criteria of St Gallen classification (2013 and 2015 classification systems were applied in the first and the two latter articles, respectively). After standard fixation and embedding of tissue samples, formalin-fixed paraffin-embedded blocks were cut into 4 µm thick sections and subsequently immunohistochemistry for chymase, tryptase, CD45RO, CD20, CD56, CD8, FOXP3 and GATA3 was performed to identify investigated populations of immune cell infiltrate. Immunohistochemical staining was performed by routine manual method used in the Department of Pathomorphology. The densities of positively-stained cells were evaluated in light microscope. The numbers of mast cells, NK cells, cytotoxic and regulatory cells were expressed as a sum of positively-stained cells obtained from 5 power fields at magnification of 400x (which represented area of 1 mm² of tissue), either within islets of neoplastic cells or in adjacent tissue. At the same locations the percentages of tissue area occupied by T and B cells were assessed and expressed as an averaged value obtained from 5 power fields at magnification of 100x. In addition, for cytotoxic, regulatory and Th2 cells we assessed their percentages in mononuclear cell infiltrate, located in immediate surrounding of tumor, and averaged their values from 5 power

fields at magnification 400x. The obtained results were referred to clinicopathological data and subjected to statistical analysis with the use of Statistica software.

Results and conclusions

We observed the differences in densities of the investigated cells with regard to the molecular subtype of breast cancer. For tryptase- and chymase-positive mast cells, significantly higher infiltrate of these cells were noted in post-hoc test within neoplastic tissue of luminal A and B tumors, as compared to non-luminal HER2-overexpressing lesions and triple-negative breast cancers (TNBC). Inverse relationship was noted for lymphoid cells; out of all subtypes, luminal A tumors were characterized by the lowest density of T cells, both in intratumoral area (significant difference in comparison with TNBC tumors) and at tumor edge (significant differences were observed as compared to TNBC, non-luminal HER2-overexpressing and luminal B/ HER2-overexpressed cancers). Moreover, in post-hoc analysis significantly less intensive B-cell infiltrate was found at the invasion front of luminal A lesions than in TNBC and HER+ non-luminal tumors. Likewise, luminal A and B phenotypes were associated with lower density of NK cells located at invasive edge in comparison with TNBC tumors. Cytotoxic and regulatory cells observed at tumor edge were significantly more numerous in non-luminal HER2-positive and TNBC than in luminal A cancers; for regulatory cells, the latter relationship was noted within islets of cancer cells either. Additionally, density of regulatory cells located at the tumor edge differed between luminal A and B subtypes, with their higher numbers in the latter one. Higher regulatory/ Th2 cell percentages ratio was observed in infiltrates of non-luminal HER2-overexpressing tumors as compared to luminal A cancers.

Relationship between increased densities of immune cells and HER2-overexpression was found for T cells, B cells, regulatory and cytotoxic cells, exclusively at tumor edge. An inverse relationship was shown for chymase- and tryptase-positive mast cells of invasion front.

Positive correlations between ER and PR expressions were obtained for chymase- and tryptase-positive mast cells as well as for the percentage of Th2 cells in immune infiltrate and cytotoxic/ Th2 cell percentage ratio; negative correlations were observed for T cell, B cell, NK cell, cytotoxic cell and regulatory cell (both regarding their numbers and percentages in immune infiltrate) densities, as well as for regulatory/ Th2 cell percentage ratio. Concerning tumor proliferation index, we observed an inverse relationship between Ki67 protein expression in tumor cells and numbers of chymase- and tryptase-positive mast cells; positive

correlation was found for T cell, B cell, NK cell and cytotoxic cell densities, as well as for regulatory cell level (both in their number and percentage in immune infiltrate) and regulatory/ Th2 cell percentage ratio.

Higher histologic grade of breast cancer was associated with lower numbers of tryptase-positive mast cells and intratumoral chymase-positive mast cells, as well as with more dense T and B cell infiltrate, more numerous NK cells at invasion front of the tumor, higher quantities of cytotoxic and regulatory cells, increased percentage of regulatory cells in tumor-surrounding infiltrate and higher regulatory/ Th2 percentage ratio.

Invasive breast tumors of diameter larger than 2 cm (pT>1) were characterized by less numerous tryptase-positive mast cells, as well as higher T cell density, more cytotoxic cells located intratumorally and higher regulatory/ Th2 cell percentage ratio in tumor-surrounding immune infiltrate. In addition, for tumors of luminal phenotype we observed relationship between greater tumor size and more dense intratumoral cytotoxic and regulatory cells, increased regulatory cell percentage in tumor-surrounding infiltrate as well as with higher regulatory/ Th2 percentage ratio.

We observed that the incidence of breast cancer metastases in lymph nodes was related to higher percentage of regulatory cells and regulatory/ Th2 cell percentage ratio in tumor surrounding stroma. For non-luminal tumors, higher cytotoxic/ regulatory cell number ratio was noted in intratumoral area of metastatic tumors.

With regard to the histologic type of breast cancer, tumor classified as no-otherwise specified (NOS) tumors were characterized by less numerous tryptase-positive mast cells within cancer cell islets, more intensive T cell, B cell and cytotoxic cell infiltrates, more dense regulatory cells at invasive edge (both regarding cell number and their percentage in tumor-associated immune infiltrate) as well as decreased intratumoral cytotoxic/ regulatory cell number ratio in comparison with cancers of lobular morphology.

The results indicate differences in composition of tumor microenvironment in various molecular subtypes of invasive breast cancers as well as with regard to the incidence of other prognostic and predictive factors in this malignancy.

- Differences in densities of selected immune cells and their correlations with ER, PR and Ki67 expressions point to relationship between mast cell infiltrate and the incidence of clinically less aggressive breast cancer subtypes, while more abundant lymphoid cell infiltrate and increased regulatory/ Th2 cell percentage ratio were related to subtypes of more adverse clinical course;

- Differences in densities of analyzed cells indicate mast cell association with more favorable prognostic factors, such as smaller tumor size, lower histologic grade; the opposite was observed for lymphoid, cytotoxic and regulatory cells;
- Distinct relationships observed for immune cell populations located either intratumorally or at invasion front suggest distinct role of these cells in pathogenesis of breast cancer with reference to location in tumor tissue;
- Differences in densities of respective T cell subpopulations observed in luminal and non-luminal invasive breast tumors of various stage (i.e. tumor size, nodal involvement) indicate distinct role of immune cells in tumor progression depending on breast cancer molecular subtype.