

НИИ онкологии
им. проф. Н.Н. Петрова
Минздрава РФ,
Санкт-Петербург

Иммунологические особенности взаимоотношения опухоли и организма при меланоме

И.А. Балдуева, канд. мед. наук

*... если в будущем
будет разработана
методика защиты от
индуцированной опухоли
иммуносупрессии, а
также усиления экспрес-
сии опухолеассоцииро-
ванных антигенов и
молекул HLA I класса на
опухолевых клетках,
то, вероятно, удастся
повысить противоопу-
холевую активность
цитотоксических
Т-лимфоцитов у больных
меланомой.*

В последние годы благодаря успехам, достигнутым в области иммунологии и молекулярной генетики, и широкому использованию современных методов исследования эволюционировали представления о взаимоотношении опухоли и организма при меланоме. С помощью моноклональных антител и техники клонирования цитотоксических Т-лимфоцитов удалось идентифицировать большое число опухолеассоциированных антигенов, экспрессируемых на клетках меланомы. Анализ экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости – HLA-антигенов с использованием полимеразной цепной реакции (RT-PCR) и моноклональных антител позволил выявить их антигенную альтерацию и различную степень утраты. Иммуногенетические исследования экспрессии опухолеассоциированных антигенов специализированными клетками иммунной системы опухоленосителя привели к интенсивному развитию активной специфической иммунотерапии.

В работах Т. Voorn с соотр. [1] с клетками мышиной мастоцитомы P815 впервые были описаны опухолеассоциированные невирусные антигены, которые вызывали специфический ответ цитотоксических Т-лимфоцитов. В исследованиях авторы использовали методы, которые позволили идентифицировать антигены на поверхности опухолевых клеток с помощью специфических клонов цитотоксических Т-лимфоцитов. Впоследствии эта стратегия была перенесена на изучение опухолей человека.

Клоны цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичные для аутологичных опухолевых клеток, были получены из периферической крови или опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов пациентов с меланомой [2]. В культуре такие клоны могли поддерживаться в течение длительного времени и использоваться для выявления опухолеассоциированных антигенов на многих образцах клеток меланомы. Этот подход позволил выявить десятки антигенов, которые распознаются противоопухолевыми клонами цитотоксических Т-лимфоцитов. В настоящее время эти антигены идентифицированы, и список их постоянно увеличивается. Вместе с тем, основываясь на образцах, экспрессирующих родственные белки, опухолеассоциированные антигены могут быть разделены на 5 групп [21] (рис.1).

1. Антигены, кодируемые генами, находящимися в состоянии покоя в большинстве нормальных клеток, но активированные в различных типах раковых клеток. К таким антигенам относятся антигены, кодируемые генами семейства MAGE.

2. Дифференцирующие антигены, которые представлены только в клетках меланомы и меланоцитах (например, тирозиназа).

3. Антигенные пептиды, полученные из тканеспецифических белков, которые подвержены мутациям в опухолевых клетках. В настоящее время эти белки обнаружены в ряде несвязанных друг с другом опухолях и обнаруживают эффект активированных белков. Некоторые из этих мутаций могут быть вовлечены в онкогенез.

4. Антигены, кодируемые немутированными генами и экспрессированные в нормальных клетках, но в большинстве раковых клеток наблюдается их сверхэкспрессия.

5. Вирусные антигены (например, антигены, кодируемые вирусом папилломы человека).

Таким образом, антигенными мишенями для клеток иммунной системы могут быть самые разнообразные структуры опухолевых клеток, часть из которых достаточно полно охарактеризована, другие гипотетичны и находятся в стадии изучения.

В связи с этим возникает вопрос, почему иммунная система не элиминирует антигенные раковые клетки? В настоящее время предлагается много объяснений:

- отсутствие стимуляции иммунной системы, а именно, ее толерантность вследствие отсутствия распознавания опухолеассоциированных антигенов,
- проникновения лимфоцитов к опухоли,
- присутствие растворимых супрессорных факторов,
- опухолевые клетки приобретают способность избегать иммунную атаку (потеря экспрессии опухолеассоциированных антигенов, Fas-опосредованная гибель Т-

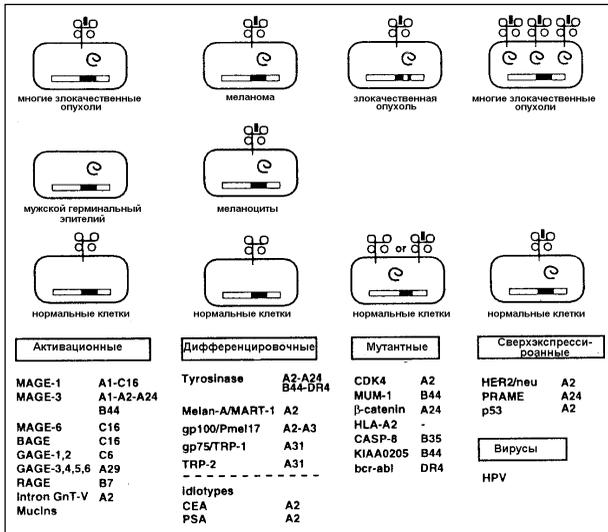


Рис. 1. 5 групп опухолеассоциированных антигенов, распознаваемых цитотоксическими Т-лимфоцитами человека (Van den Eynde and Boond, 1997).

лимфоцитов и др.).

Вероятнее всего, что среди всего этого разнообразия есть ряд механизмов, которые являются ключевыми и способствуют уклонению опухоли от воздействия эффекторов иммунной системы опухоленосителя.

Противоопухолевыми цитолитическими эффекторными клетками иммунной системы человека являются цитотоксические Т-лимфоциты и НК-клетки (естественные киллерные клетки). На клетках меланомы цитотоксические Т-лимфоциты распознают антигенные пептиды, кодируемые генами MAGE или мутантными генами, или другими генами. Вместе с тем это распознавание становится эффективным при условии одновременного узнавания антигенного пептида и молекул HLA I класса, которые представляют антигенный пептид в тесной связке со своими собственными молекулами.

В противоположность этому, НК-клетки убивают опухолевые клетки даже в случае утраты на их поверхности молекул HLA I класса. Литическая активность НК-клеток запускается посредством взаимодействия с такими рецепторами, как FcγRIII-рецепторы и некоторыми другими [3, 6, 14]. Предполагается, что они связываются с тканеспецифическими лигандами и специфичность литической активности НК-клеток реализуется в отсутствие на клетках-мишенях молекул HLA I класса.

В последние годы детально изучены два типа рецепторов на поверхности НК-клеток – киллер-ингибирующие рецепторы (KIR), распознающие собственные HLA I класса молекулы и их аллельные формы HLA-A, C, E, и киллер-активирующие рецепторы (KAR – NKp46/p44), которые активируются только при условии отсутствия киллер-ингибирующих лиганд на клетке-мишени. С этим связана избирательная способность НК-клеток распознавать и убивать клетки-мишени с пониженной экспрессией молекул HLA I класса. По механизмам цитотоксичности НК-клетки не отличаются от цитотоксических Т-лимфоцитов [17].

Вместе с тем специфический иммунный клеточный

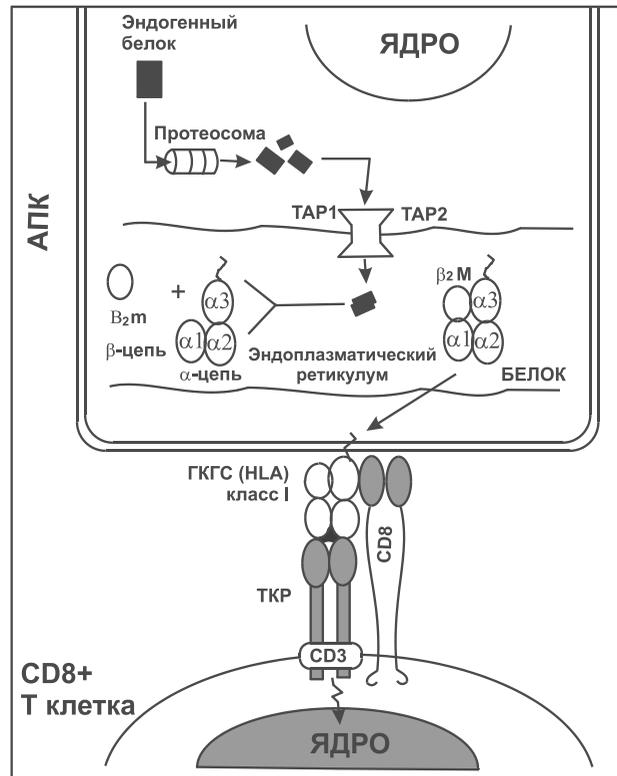


Рис. 2. Участие молекулы HLA I класса в процессе представления опухолеассоциированного антигена.

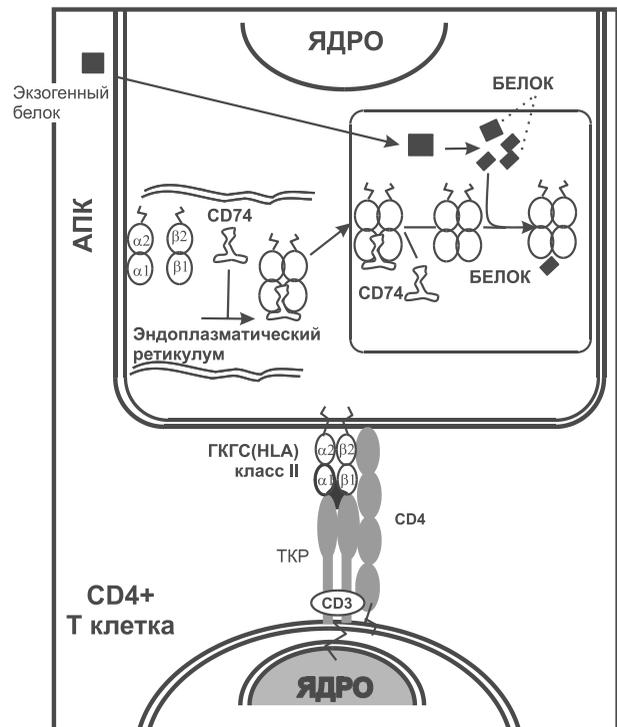


Рис. 3. Участие молекулы HLA II класса в процессе представления опухолеассоциированного антигена.

ответ на опухолеассоциированные антигены обычно опосредован CD8⁺ цитотоксическими Т-лимфоцитами. Покидающие тимус неактивированные цитотоксические Т-лимфоциты готовы к распознаванию антигенных

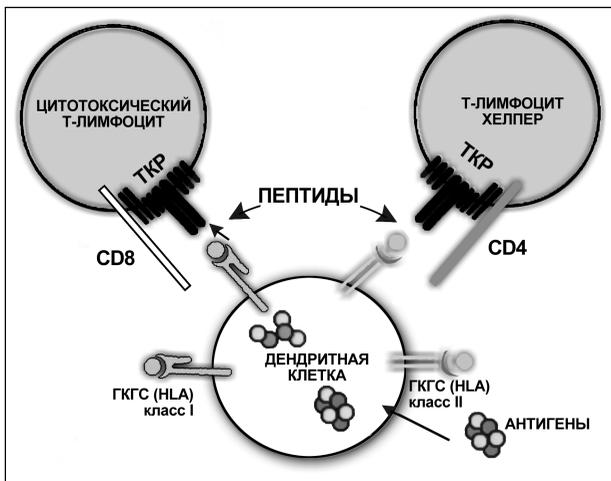


Рис. 4. Участие дендритной клетки в представлении опухолеассоциированных антигенов.

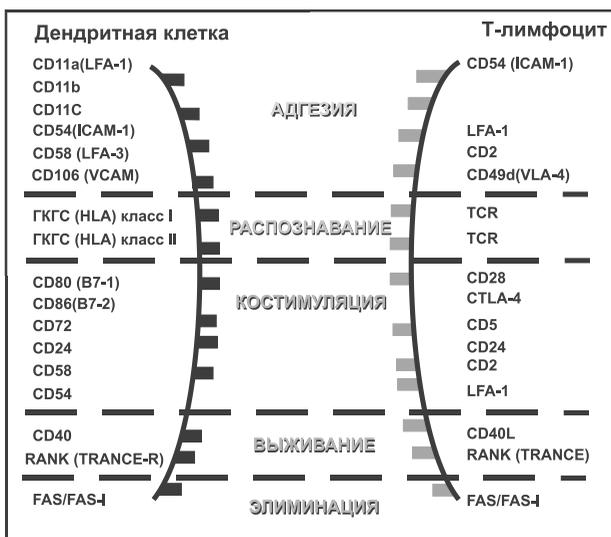


Рис. 5. Механизм взаимодействия: дендритная клетка / Т-лимфоцит.

пептидов в комплексе с молекулами HLA I класса, как на поверхности соматических клеток (рис. 2), так и на специализированных антигенпрезентирующих клетках иммунной системы (В-лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки и др.) (рис. 3). Высокоспециализированными антигенпредставляющими клетками иммунной системы являются дендритные клетки, которые экспрессируют большое количество HLA-молекул класса I и II, а также вспомогательные костимулирующие молекулы (рис. 4). Дендритные клетки представляют пептиды опухолеассоциированных антигенов захваченных опухолевых клеток и связанных с собственными молекулами HLA I класса для CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов и одновременно представляют иную конфигурацию пептидов того же самого опухолеассоциированного антигена, но уже связанного с собственными молекулами HLA II класса для CD4⁺ Т-хелперов (рис. 5). При этом Т-хелперы, продуцируют цитокины, которые усиливают активность дендритных клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов [20].

Главной особенностью дендритных клеток является их миграционная способность, которая позволяет им

транспортировать захваченный на периферии опухолеассоциированный антиген в периферические лимфоидные органы [19]. Дендритные клетки сами способны контролировать свою миграцию путем продукции хемокинов, последние, блокируя их же рецепторы, модулируют их чувствительность к действию разных стимулов [5].

Активация цитотоксических Т-лимфоцитов и усиленная их пролиферация в периферических лимфоидных органах приводит к накоплению клона антигенспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов, способных распознавать соответствующие антигенные пептиды, связанные с молекулами HLA I класса на поверхности опухолевых клеток и убивать их уже без помощи вспомогательных костимулирующих молекул. Такие активированные цитотоксические Т-эффекторы приобретают специфический иммунологический фенотип: усиленную в 2–4 раза экспрессию адгезивных молекул для взаимодействия с комплементарными молекулами на клетках-мишенях, замену молекул L-селектина на молекулы VLA-4, способствующих миграции к опухоли. Движение активированных антигенспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов в опухолевое образование зависит от процессов прилипания к эндотелию сосудов, выхода из посткапиллярных венул, действия хемокинов.

Собственно цитотоксическое действие начинается с адгезии цитотоксических Т-лимфоцитов к трансформированной опухолевой клетке за счет адгезионных молекул. После распознавания иммуногенного комплекса (антигенный пептид/HLA I класса) и связывания с ним антигенспецифического Т-клеточного рецептора на цитотоксических Т-лимфоцитах межклеточная связь усиливается и на образовавшемся участке теснейшего контакта мембран клеток происходит направленная секреция (экзоцитоз) эффекторных молекул цитотоксических Т-лимфоцитов, в которых наблюдается выраженная поляризация с максимальной концентрацией специфических гранул в участке контакта с опухолевой клеткой. У активированных цитотоксических Т-лимфоцитов наблюдается повышенная эффективность трансдукции сигнала от антигенспецифических Т-клеточных рецепторов к ядру клетки. Среди эффекторных молекул цитотоксических Т-лимфоцитов основными являются порообразующие белки – перфорины и сериновые протеазы – грензимы. Перфорины в присутствии ионов кальция полимеризуются в липидном би-слое мембраны опухолевой клетки, формируя поры. Сами цитотоксические Т-лимфоциты резистентны к действию перфорины, который разрушается на их мембранных белках. Через сформировавшиеся поры в опухолевую клетку поступают грензимы (фрагментин) – сериновые протеазы, опосредующие цитотоксическое действие. Кроме того, цитотоксические Т-лимфоциты содержат связанные с мембраной эффекторные молекулы, опосредующие перфорин-независимую цитотоксичность. Fas-лиганда – мембраноассоциированная молекула из семейства молекул фактора некроза опухоли связывается с Fas-молекулой (APO-1) на опухолевых клетках. Связывание Fas-лиганда с Fas-молекулой на мембране опухолевой клетки ведет к ее гибели через апоптоз (программированная клеточная гибель).

Апоптоз проявляется фрагментацией ядра за счет активации эндогенных нуклеаз, которые разрушают связь между нуклеосомами. Вместе с тем индукция апоптоза может быть и обратной: при экспрессии Fas-лигандов на опухолевых клетках они могут индуцировать апоптоз как цитотоксических Т-лимфоцитов, так и дендритных клеток, экспрессирующих Fas-молекулы [15].

Специфический ответ цитотоксических Т-лимфоцитов на опухолеассоциированные антигены обеспечивает накопление в организме клона клеток-эффекторов с наиболее выраженным потенциалом противоопухолевой цитотоксической активности и способностью мигрировать к опухоли. Вместе с тем далеко не все опухолеассоциированные антигены проявляют иммуногенность, достаточную для формирования специфического клона цитотоксических Т-лимфоцитов. Ограничением возможностей клеточного иммунного ответа служит также необходимость комплексирования антигенных пептидов с молекулами HLA I класса для распознавания их Т-клеточными рецепторами цитотоксических Т-лимфоцитов. Наиболее очевидным механизмом, посредством которого опухолевые клетки становятся резистентными к воздействию цитотоксических Т-лимфоцитов, является потеря ими экспрессии HLA-молекул.

Утрата экспрессии HLA-молекул часто наблюдается в злокачественных опухолях [9, 13]. Полная потеря многократно была обнаружена на секционном материале при помощи моноклональных антител, распознающих неpolиморфные детерминанты HLA I класса. Сложнее установить потерю гаплотипов или аллелей, но, для примера, исследование с анти-HLA-A2 моноклональными антителами выявило, что частичная потеря HLA-молекул является достаточно частым явлением [4, 11]. Утрату экспрессии HLA-молекул на опухолевых клетках обычно связывают с иммуноселекцией и идентификацией клонов цитотоксических Т-лимфоцитов, для которых они становятся мишенью, подтверждает эту концепцию. Высокое соотношение опухолей с частичной или полной утратой HLA-молекул обусловлено тем, что иммунная система наиболее активно противостоит возникновению клеток, атипичных для данного организма. Однако к этим предположениям надо относиться с осторожностью, так как несмотря на высокую частоту феномена потери HLA-молекул на опухолевых клетках, многие авторы, тем не менее, получают длительные ремиссии с помощью стимуляции опухоль-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов *in vivo*. Важно, что полная утрата HLA-молекул обычно ассоциируется с дефектом β_2 -микроглобулина или с транспортом антигенных пептидов на поверхность клетки.

Вместе с тем дефекты β_2 -микроглобулина не всегда связаны с полной утратой HLA-молекул I класса. Р. Jimenez и сопр. [10] показали, что среди 12,7% случаев полной утраты экспрессии HLA-ABC на поверхности клеток меланомы, только в 2,5% случаев были выявлены мутации в гене β_2 -микроглобулина.

Как показано для клеточной линии нейробластомы и других HLA класс-I-дефицитных линий опухолевых клеток полная утрата HLA-молекул I класса может возникнуть после изменения связывания общих ядерных

регуляторных факторов с промотором в гене β_2 -микроглобулина [7]. Однако эти мутации в очень небольшом проценте случаев связаны с утратой экспрессии молекул HLA I класса на клетках меланомы [16].

Таким образом, выявленные нарушения в регуляции экспрессии молекул HLA I класса на клетках меланомы очень часто ассоциируются с низкой иммуногенностью опухолевых клеток. Недавние клинические наблюдения показали, что в ранней стадии прогрессии опухолевые клетки экспрессируют HLA-молекулы I класса, в то время как клетки более поздних стадий содержали эти молекулы в меньшем количестве или же вообще их не имели [6]. Недостаток экспрессии на опухолевых клетках молекул HLA I класса коррелирует с прогрессией их злокачественности. Отсюда следует важный вывод: опухолевые клетки, содержащие большое количество HLA-молекул I класса, должны элиминироваться иммунными Т-лимфоцитами, а клетки, не содержащие таких антигенов, способны «ускользнуть» от цитотоксического действия Т-лимфоцитов. Кроме того, эти изменения сопровождались резистентностью к иммунотерапии, которая была направлена на активацию Т-лимфоцитов, ассоциированных с утратой функции β_2 -микроглобулина на поверхности опухолевых клеток.

Синтез опухолевыми клетками иммуносупрессорных веществ играет важную роль в развитии механизмов «ускользания» этих клеток от действия факторов иммунной системы, особенно на ранних стадиях опухолевой прогрессии. Вещества, продуцируемые опухолевыми клетками, могут ингибировать активность НК-клеток путем блокирования рецепторов на эффекторной клетке. Быстро наступающий и прогрессирующий недостаток НК-клеток в процессе развития первичных и спонтанных опухолей обусловлен не их исчезновением, а инактивацией эффекторов супрессивными веществами.

Опухолевые клетки продуцируют и выделяют в окружающую среду вещества, которые угнетают функцию периферических дендритных клеток: их адгезивность, способность к миграции и хемотаксису, формирование колоний костномозгового происхождения, захватывающие свойства, эффективную экспрессию костимулирующих молекул и др. Синтез таких иммуносупрессивных веществ оказывает заметное воздействие на реализацию противоопухолевого иммунного ответа [22].

Основываясь на публикациях большого количества доклинических исследований, а также значительно меньшем количестве клинических данных, мы можем сделать вывод, что у онкологических больных функция дендритных клеток, так же как и их генерация, снижена. В ряде исследований было показано выраженное снижение экспрессии костимулирующих молекул на дендритных клетках, необходимых для индукции пролиферации Т-клеток, которые находятся в опухолевом микроокружении [8, 12]. В случае низкого содержания костимулирующих молекул на дендритных клетках, вместо стимуляции и образования специфического клона цитотоксических Т-лимфоцитов, можно ожидать Т-клеточную анергию и даже апоптоз.

Дальнейший прогресс в этой области зависит от

понимания роли различных факторов в регуляции развития и функциональной активности дендритных клеток у больных при меланоме. Если появится возможность нормализовать созревание дендритных клеток в организме опухоленосителя и стимулировать нормальную генерацию дендритных клеток, или хотя бы сохранить их функции на определенном уровне, появится перспектива развития иммунотерапии, основанной не только на Т-клетках, но также и на цитокинах. В настоящее время в исследованиях, проведенных M.R. Shurin и сотр. (1998), было показано, что контакт между опухолевыми клетками и дендритными клетками действительно может быть причиной апоптоза или программированной клеточной гибели. В последние годы схожие данные были получены для Т-клеток при меланоме. Было показано, что

фактор, который продуцирует опухоль, например, Fas-лиганд, может быть или связанным с ее мембранной, или может существовать в растворимой форме и являться причиной апоптоза Т-лимфоцитов. Недавно такие же данные были получены и для других иммуноэффекторных клеток, таких как НК-клетки и эозинофилы. Таким образом, это означает, что многие иммуноэффекторные клетки погибают в опухолевом микроокружении.

Следовательно, если в будущем будет разработана методика защиты от индуцированной опухолью иммуносупрессии, а также усиления экспрессии опухолеассоциированных антигенов и молекул HLA I класса на опухолевых клетках, то, вероятно, удастся повысить противоопухолевую активность цитотоксических Т-лимфоцитов у больных меланомой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boon T. // *Adv. Cancer Res.* — 1992. — Vol. 58. — P. 177–210.
2. Boon T., Cerottini J.-C., Van den Eynde B. et al. // *Ann. Rev. Immunol.* — 1994. — Vol. 12. — P. 337–365.
3. Bottino C., Sivori S., Vitale M. et al. // *Europ. J. Immunol.* — 1997. — Vol. 26. — P. 1816–1824.
4. Cabrera T., Fernandez M.A., Sierra A. et al. // *Human Immunol.* — 1996. — Vol. 50. — P. 127–134.
5. Cella M., Engering A., Pinet V. et al. // *Nature.* — 1997. — Vol. 388. — P. 782–787.
6. Coulie P.G., Ikeda H., Baurain J.-F., Chiari R. // *Adv. Cancer Res.* — 1999. — Vol. 76. — P. 6213–242.
7. Drew P.D., Lonergan M., Goldstein M.E. et al. // *J. Immunol.* — 1993. — Vol. 150. — P. 3300–3307.
8. Enk A.H., Jonuleit H., Saloga J., Knop J. // *Int. J. Cancer.* — 1997. — Vol. 73. — P. 309–316.
9. Garrido F., Cabrera T., Lopez-Nevot M.A. et al. // *Adv. Cancer Res.* — 1995. — Vol. 67. — P. 155–195.
10. Jimenez P., Canton J., Cabrera T. et al. // *Cancer Immunol. Immunother.* — 2000. — Vol. 48. — P. 684–690.
11. Kageshita T., Wang Z., Calorini L. et al. // *Cancer Res.* — 1993. — Vol. 53. — P. 3349–3354.
12. McLellan A., Heldmann M., Terbeck G. et al. // *Europ. J. Immunol.* — 2000. — Vol. 30. — P. 2612–2619.
13. Momburg F., Ziegler A., Harpprecht J. et al. // *J. Immunol.* — 1989. — Vol. 142. — P. 352–358.
14. Moretta A. and Moretta L. // *Curr. Opin. Immunol.* — 1997. — Vol. 9. — P. 694–701.
15. O'Flaherty E., Wong W.-K., Pettit S.J. et al. // *Immunology.* — 2000. — Vol. 100. — P. 289–299.
16. Perez B., Benitez R., Fernandez M.A. et al. // *Tissue Antigens.* — 1999. — Vol. 53. — P. 569–574.
17. Phillips J.H., Gumperz J.E., Parham P., Lenier L.L. // *Science.* — 1995. — Vol. 268. — P. 403–405.
18. Sivori S., Vitale M., Morelli L. et al. // *J. Exp. Med.* — 1997. — Vol. 186. — P. 1129–1136.
19. Steinman R., Pack M., Inaba K. // *Immunol. Rev.* — 1997. — Vol. 156. — P. 25–37.
20. Svensson M., Stockinger B., Wick M.J. // *J. Immunol.* — 1997. — Vol. 158. — P. 4229–4236.
21. Van der Eynde B., Van der Bruggen P. // *Curr. Opin. Immunol.* — 1997. — Vol. 9. — P. 684–693.
22. Wright-Browne V., McClain K.L., Talpaz M. et al. // *Hum. Pathol.* — 1997. — Vol. 28. — P. 563–579.