

# КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛ LAG3 И GITR ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**Н.В. Чантурия<sup>1</sup>, Т.М. Заботина<sup>2</sup>, И.К. Воротников<sup>2</sup>, В.Ю. Сельчук<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва

<sup>2</sup> ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

**Цель исследования.** Провести систематический анализ данных, имеющихся в современной литературе, о клиническом значении молекул LAG3 и GITR при раке молочной железы.

**Методы исследования.** В обзор включены данные зарубежных и отечественных статей, найденных в PubMed по данной теме, опубликованных за последние 10 лет.

**Результаты исследования.** В онкологическую практику последнего десятилетия активно внедряются методы воздействия на контрольные точки иммунитета с помощью таргетной иммунотерапии. Это позволило изменить прогноз для многих больных с различными формами онкологических заболеваний, в частности, меланомы, рака легкого, почечно-клеточного рака. Наиболее изученными ингибиторными рецепторами регуляторных T-клеток являются CTLA-4 (CD152) и PD-1, на основе которых создан целый ряд иммунотерапевтических препаратов (ипилимумаб, ниволумаб, пембролизумаб и др.), позволяющих улучшить результаты лечения пациентов даже при диссеминированных формах заболевания. Это диктует необходимость проведения исследований роли других молекул, экспрессированных на регуляторных клетках, таких как LAG-3 и GITR, в реализации молекулярных механизмов генерации эффективного иммунного ответа у онкологических больных. В данной статье рассмотрены результаты исследований на тему изучения значимости молекул LAG3 и GITR при раке молочной железы.

**Ключевые слова:** контрольная точка иммунитета, LAG3, GITR, рак молочной железы.

## CLINICAL SIGNIFICANCE OF LAG3 AND GITR MOLECULES IN BREAST CANCER

**N.V. Chanturiya<sup>1</sup>, T.M. Zabolina<sup>2</sup>, I.K. Vorotnikov<sup>2</sup>, V.Yu. Selchyuk<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

**Objective of the study** — is to carry out a systematic analysis of the data available in current literature on the clinical significance of LAG3 and GITR molecules in breast cancer.

**Materials and Methods.** The review comprises the data obtained from foreign and Russian academic articles found in PubMed on the subject published over the past 10 years.

**Results of the study.** Methods that act on immune checkpoints using targeted immunotherapy have been actively introduced into oncologic practice over the past decade. This made it possible to change the prognosis for many patients with various types of cancer; including in particular melanoma, lung cancer, renal cell carcinoma. CTLA-4 (CD152) and PD-1 are the most studied inhibitory receptors of regulatory T-cells and a wide range of immunotherapy medicines (ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab and etc.), which allowed to improve the results of the treatment of patients even with disseminated cancer, were created on their basis. This necessitates further research of the role of other molecules expressed on regulatory cells such as LAG-3 and GITR in the identification of molecular mechanisms of the generation of an effective immune response in cancer patients. This article concerns the results of the research on the subject of the significance of LAG3 and GITR molecules in breast cancer.

**Keywords:** immune checkpoint, LAG3, GITR, breast cancer.

Рак молочной железы (РМЖ) долгие годы занимает первое место в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями среди женского населения. Прирост стандартизованного показателя заболеваемости РМЖ в России за последние 10 лет составил 33,38% [1].

На сегодняшний день существуют общеизвестные клинико-патологоанатомические данные опухоли, позволяющие прогнозировать течение заболевания: ее размер, гистологическая форма, степень ее злокачественности, наличие рецепторов эстрогена и прогестерона, экспрессия онкобелка Her2, индекса пролиферации Ki67, количество пораженных регионарных лимфатических узлов, наличие мутации генов *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*.

В зависимости от стадии заболевания, морфологических и молекулярно-биологических подтипов опухоли выявлены различные алгоритмы лечения РМЖ.

Несмотря на это, отдаленные результаты лечения остаются малоудовлетворительными. Это ведет к необходимости поиска новых мишеней для лечения РМЖ.

В настоящее время не вызывает сомнений утверждение, что иммунная система способна распознавать опухоль и генерировать как локальный, так и системный иммунный ответ, направленный на подавление опухолевого роста [2].

Элементы как врожденного, так и адаптивного иммунитета, такие как естественные клетки-киллеры (НК), НКТ-клетки, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, специфические цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), антитела и некоторые цитокины, наряду с другими своими функциями проявляют, в том числе и противоопухолевую активность [3].

LAG-3 (lymphocyte activation gene-3, CD223) является молекулой, гиперэкспрессированной на активированных CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> эффекторных Т-клетках, CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg<sup>-</sup>, Tr1<sup>-</sup>, В-клетках, плазматоцитидных дендритных клетках (pDCs) и натуральных киллерах (НК). Механизм супрессии Т-клеток остается неясным, но известно, что, сопровождая TCR-активацию, LAG-3 взаимодействует с CD3, опосредуя угнетение трансдукции сигнала, что приводит

к снижению пролиферации Т-клеток и синтеза цитокинов (например, IFN- $\gamma$ , IL-2, ФНО- $\alpha$ ) [4]. LAG-3 и PD-1 часто коэкспрессируются и активируются на опухоль инфильтрирующих лимфоцитах (TIL), что приводит к истощению иммунитета и росту опухоли. Таким образом, LAG-3 представляет интересную мишень для иммунотерапии, и существует ряд текущих клинических испытаний на ранней фазе, в которых тестируются антитела против LAG-3 при различных типах рака [4].

Глюкокортикоид-индуцированный белок семейства рецепторов TNF (GITR) является костимулирующим поверхностным рецептором клетки, который экспрессируется Т-клетками и НК-клетками, и его экспрессия значительно увеличивается после активации Т-клеток. Его лиганд, GITR-L, в основном, экспрессируется APC (антигенпрезентирующими клетками) и эндотелиальными клетками и, по-видимому, играет роль в активизации иммунной системы, адгезии лейкоцитов и их миграции. Установлено, что экспрессия GITR в опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах выше, чем экспрессия в лимфоцитах периферической крови, что указывает на локальную активацию Т-клеток.

Комбинированные методы лечения, направленные на ингибирование PD-1 и активацию GITR для увеличения активности Т-клеток, в настоящее время проходят раннюю фазу клинических испытаний для пациентов с метастатической меланомой и другими солидными опухолями [5].

Микроокружение опухоли представляет собой сложную сеть, состоящую из внеклеточного матрикса, стромальных клеток (фибробласты, эндотелиальные клетки) и иммунных клеток (Т-клетки, В-клетки, естественные клетки-киллеры, дендритные клетки, макрофаги и миелоидные клетки). Сложные взаимодействия между опухолевыми клетками внутри микроокружения играют важную роль в прогрессировании и инвазии опухоли, активации ангиогенеза [6]. Высокая экспрессия регуляторных клеток в опухолевом микроокружении играет значительную роль в подавлении противоопухолевого иммунитета, что связано с плохим прогнозом и прогрессированием заболевания [7].

В исследовании L.T. Krautz с соавт. был оценен уровень экспрессии шести контрольных точек иммунитета и обнаружено, что уровни PD-1, CTLA-4, TIM-3 и LAG-3 были значительно повышены в тканях опухоли молочной железы по сравнению с нормальной тканью. Кроме того, CpG-островки промотора PD-L1 были полностью деметилированы (100%), LAG-3 подвержены высокой степени метилирования (80–90%) [8].

В Китае было проведено исследование под руководством S. Virugu касательно экспрессии LAG-3 и прогностической значимости данной молекулы [4]. Также была установлена корреляция экспрессии LAG-3 с молекулами PD-1 и PD-L1. В исследование были включены 4322 женщины с диагнозом рак молочной железы. Результаты исследования показали, что внутриэпителиальные опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (iTILs), экспрессирующие LAG-3, были достоверно ассоциированы с негативными прогностическими факторами: молодым возрастом, большим размером опухоли, высокой пролиферацией, HER2 положительным статусом опухоли и базальными подтипами РМЖ. При многофакторном анализе выявлено, что у больных РМЖ с экспрессией LAG-3 была достоверно улучшена специфическая выживаемость (BCSS) (HR: 0,71,95% CI 0,56–0,90), особенно среди пациентов с ER-подтипом РМЖ (HR: 0,50,95% CI 0,36–0,69). Кроме того, было обнаружено, что 53% случаев PD-L1+ и 61% случаев PD-1+ также были положительны в отношении экспрессии LAG-3+iTILs. Одновременная экспрессия LAG-3+iCD8+iTILs была достоверно ассоциирована с повышением уровня специфической выживаемости при РМЖ (BCSS) (HR: 0,49,95% CI 0,32–0,74). Выводом данного исследования послужило то, что экспрессия молекулы LAG-3+iTILs в большей степени ассоциирована с ER-подтипом РМЖ и представляет собой независимый благоприятный прогностический фактор. Кроме того, высокая доля опухолей PD-1/PD-L1+ совместно экспрессируется с LAG-3+TILs, поддерживая потенциальную стратегию совместной блокады этих чекпойнтов в качестве варианта лечения больных РМЖ [4].

Исследование E. Khalifa с соавт. было направлено на оценку экспрессии ряда значимых маркеров, связанных с Treg-клетками, мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) у больных ранним РМЖ. Экспрессия мРНК FOXP3, CTLA-4 и GITR в нестимулированных PBMC у пациенток, болеющих РМЖ, была значительно выше, чем у здоровой контрольной группы ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,03$  и  $P < 0,04$ , соответственно). Аналогично, экспрессия транскриптов FOXP3, CTLA-4 и GITR в РНА-стимулированных PBMC у больных РМЖ была значительно увеличена по сравнению со здоровыми женщинами ( $P < 0,01$ ,  $P < 0,005$  и  $P < 0,01$ , соответственно) [5].

Существуют также данные исследования, согласно которому PD-1 и LAG-3 были одновременно экспрессированы приблизительно у 15% пациентов с тройным отрицательным РМЖ (TNBC) [9]. Более того, авторами обнаружено, что экспрессия как PD-1, так и LAG-3 сильно коррелирует с присутствием TIL, особенно цитотоксических клеток CD8+, но не была достоверно связана с прогнозом заболевания [10].

Исследование, недавно проведенное в Брюсселе, показало, что экспрессия молекулы LAG3 была связана с положительным клиническим прогнозом при базальноподобном РМЖ и также часто экспрессировалась с другими чекпойнтами, такими как TIM3. В нескольких современных исследованиях РМЖ экспрессия LAG3 была изучена с использованием метода иммуногистохимии для выявления корреляции между наличием экспрессии данной молекулы и прогнозом заболевания [7].

В Иранском институте иммунологии было проведено исследование, цель которого заключалась в оценке экспрессии ряда важных Treg-клеточных маркеров мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) у женщин со впервые выявленным РМЖ. В исследование были включены 20 женщин с диагнозом рак молочной железы и 20 женщин — контрольная группа, у которых проводилась оценка экспрессии транскриптов FOXP3, CTLA-4 и GITR с использованием метода полимеразной цепной реакции [5].

Экспрессия мРНК FOXP3, CTLA-4 и GITR стимулированных ФГА-РВМС больных РМЖ была достоверно выше, чем у здоровых лиц контрольной группы ( $P < 0,05$ ,  $P < 0,03$  и  $P < 0,04$ , соответственно). Экспрессия транскриптов FOXP3, CTLA-4 и GITR стимулированных ФГА-РВМС больных РМЖ была достоверно повышена по сравнению со здоровой группой ( $P < 0,01$ ,  $P < 0,005$  и  $P < 0,01$ , соответственно).

Как в контрольной группе, так и в группе больных РМЖ ФГА-индуцированная экспрессия мРНК GITR была ниже, чем у РВМС-нестимулированных, но различия не были значимыми ( $P < 0,04$  и  $P < 0,01$ , соответственно).

Исходя из этих данных, можно сделать вывод: повышенная экспрессия FOXP3, CTLA-4 и GITR представляет собой более высокую активность Treg-клеток у больных РМЖ, что может играть важную роль в формировании и развитии опухоли, соответственно и влиять на прогноз заболевания [5].

В свете всего изложенного можно резюмировать следующее. Совместная блокада контрольных точек иммунитета, в частности PD1 и LAG-3, может быть более результативной с точки зрения лечения отдельной группы пациентов, нежели блокада одной из молекул, учитывая их частый синергизм. Последние достижения в исследованиях РМЖ свидетельствуют, что эпигенетические модификации коррелируют с развитием и прогрессированием заболевания. Более глубокое понимание этих эпигенетических регуляций может проложить путь к продвижению концепции таргетных препаратов иммунотерапии РМЖ. Становится очевидной необходимость дальнейших исследований в этой области, результаты которых могут стать основой для разработки индивидуальных подходов к лечению больных РМЖ с учетом функционирования иммунокомпетентных клеток, что является актуальной задачей в онкологии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. (ред.). Состояние онкологической помощи населению России в 2015 г. — М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ НМИРЦ Минздрава России, 2016. — 18 с.
2. Gutkin D.W., Shurin M.R. Clinical evaluation of systemic and local immune responses in cancer: time for integration // *Cancer Immunol. Immunother.* 2014;63(1):45–57.
3. Khalil D.N., Smith E.L., Brentjens R.J., Vulchok J.D. The Future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy // *Nat Rev Clin Oncol.* 2016 May;13(5):273–290.
4. Burugu S., Gao D., Leung S., Chia S.K., Nielsen T.O. LAG-3+ tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer: clinical correlations and association with PD-1/PD-L1+tumors // *Ann Oncol.* 2017;28:2977–2984.
5. Khalife E., et al. Overexpression of Regulatory T Cell-Related Markers (FOXP3, CTLA-4 and GITR) by Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Breast Cancer // *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018 Nov 28;19(11):3019–3025.
6. Koontongkaew S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas // *J Cancer.* 2013;4(1):66–83.
7. Solinas S. Immune control molecules on tumor infiltrating lymphocytes and their connection with tertiary lymphoid structures in human breast cancer // *Front Immunol.* 2017;8:1412.
8. Krautz L.T., Fischer-Fodor E., Major Z.Z., Fetica B. Regulatory subgroups of T cells that express GITR increase in tumor-positive lymph nodes in patients with advanced breast cancer compared to tumor-negative lymph nodes // *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2012 Jan–Mar;25(1):59–66.
9. Bottai G., Raschioni S., Losurdo A., Di Tommaso L., Tinterri S., Torrisi R., Reis-Filii J.S., Roncalli M., Sotiriou S., Santoro A., et al. Immune stratification identifies a subset of PD-1/Lag-3 with double positive triple negative breast cancer // *Breast Cancer Research.* 2016;18:121.
10. Johnson D.B., Nixon M.J., Vang Y., Vang D.Y., Castellanos E., Estrada M.V., Eriksson-Gonzalez P.I., Cote K.H., Salgado R., Sanchez V., et al. Tumor-specific MHC-II expression drives a unique pattern of resistance to immunotherapy via LAG-3/FCRL6 engagement // *JCI Insight.* 2018;3(24):e120360. doi: 10.1172/jci.insight.120360.



**АВТОРЫ**

*Чантурия Наиля Валерьевна*, аспирант кафедры ФДПО онкологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, 127473, Москва, Делегатская ул., 20, стр. 1, e-mail: naily.chanturiya@gmail.com

*Chanturia Naily V.*, Post-graduate student of the Department of Oncology, faculty of postgraduate education, Federal State Budgetary Educational Institution of the Higher Education «A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127473, Moscow, Delegate str., 20, e-mail: naily.chanturiya@gmail.com

*Заботина Татьяна Николаевна*, доктор биологических наук, заведующая отделением лаборатории клинической иммунологии опухолей НИИ клинической онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское ш., 24, e-mail: tatzabotina@yandex.ru

*Zabotina Tatiana N.*, MD, Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, e-mail: tatzabotina@yandex.ru

*Воротников Игорь Константинович*, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник хирургического отделения №15 (комбинированного лечения опухолей молочной железы) НИИ клинической онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское ш., 24, e-mail: i.vorotnikov@mail.ru

*Vorotnikov Igor K.*, MD, RhD, Prof., DSc, Leading Researcher of the surgical Department No. 5 Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, e-mail: i.vorotnikov@mail.ru

*Сельчук Владимир Юрьевич*, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой ФДПО онкологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, 127473, Москва, Делегатская ул., 20, стр. 1, e-mail: selvu@mail.ru

*Selcuk Vladimir Y.*, M.D., Ph.D. in Medical Sciences, Prof., Head of the Oncology Department of Postgraduate Education, Federal State Budgetary Educational Institution of the Higher Education «A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127473, Moscow, Delegate str., 20, e-mail: selvu@mail.ru