

M. F. Meyer¹ · C. Arolt² · B. A. Kansy¹ · J. Doescher³ · A. Quaas² · D. Beutner⁴ · S. Lang¹ · J. P. Klußmann⁵

¹ Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland

² Institut für Pathologie, Medizinische Fakultät und Uniklinik Köln, Universität zu Köln, Köln, Deutschland

³ Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, Universitätsklinikum Ulm, Ulm, Deutschland

⁴ Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, und Ohrenheilkunde, Universitätsklinik Göttingen, Göttingen, Deutschland

⁵ Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, Medizinische Fakultät und Uniklinik Köln, Universität zu Köln, Köln, Deutschland

Das Tumormikromilieu bei Speicheldrüsenkarzinomen – mögliche Konsequenzen für neue Therapiekonzepte

Die Einführung einer Therapie mit Checkpointinhibitoren hat in den letzten Jahren dazu beigetragen, bei verschiedenen Tumorentitäten die Prognose zu verbessern. Da nicht alle Patienten von den etablierten und neuen Therapiemodalitäten profitieren, kann die Analyse des Tumormilieus dabei helfen, ein mögliches Therapieansprechen abzuschätzen, immunmodulierende Ausweichmechanismen der Tumoren zu identifizieren und neue therapeutische Ansätze zu ermöglichen. In der vorliegenden Übersicht werden daher Schlüsselmoleküle und immunmodulatorische Signalwege von Patienten mit Speicheldrüsenkarzinomen untersucht, um potenzielle Ansatzpunkte zu identifizieren und neue Erkenntnisse in der Behandlung dieser Tumoren zu gewinnen.

Hintergrund

Karzinome der Speicheldrüsen („salivary gland carcinomas“, SGC) zählen zu den eher seltenen Tumorentitäten, repräsentieren aber im Fach der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde ein wichtiges onkologisches Krankheitsbild. Es han-

delt sich um eine heterogene Gruppe von bösartigen Erkrankungen mit 20 von der Weltgesundheitsorganisation definierten Subtypen. Das Mukoepidermoidkarzinom (MEC) stellt die häufigste Untergruppe dar [19].

» Entitätsspezifische genomische Translokationen mit onkogenem Treiberpotenzial gibt es bei vielen SGC

Entitätsspezifische genomische Translokationen mit onkogenem Treiberpotenzial wurden für eine Vielzahl von Speicheldrüsenkarzinomen gefunden. Insbesondere bei den häufig auftretenden Entitäten der SGC; für adenozystische Karzinome (ACC), für MEC und in jüngerer Zeit für sekretorische Karzinome und Azinuszellkarzinome wurden Translokationen nachgewiesen [2, 13, 24]. Diese Translokationen können genutzt werden, um eine zunächst histopathologisch gestellte Diagnose molekularpathologisch zu bestätigen [2, 13, 24]. Außerdem stellen diese Translokationen teilweise prognostische Prädiktoren dar. Die biologische Aggressivität variiert in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp erheb-

lich: So ist beispielsweise die Prognose von Speichelgangkarzinomen („salivary duct carcinoma“, SDC) schlecht (2-Jahres-Überleben von 60 %; 5-Jahres-Gesamtüberleben von unter 40 %) [23].

Die vollständige chirurgische Resektion (R0) ist unverändert die wichtigste Behandlungsform der SGC. Die elektive Behandlung des N0-Halses bleibt ein kontroverses Thema. Eine Strahlentherapie sollte bei Patienten mit positivem Lymphknotenstatus, High-Risk-Tumoren (G3 oder G4), ACC, unvollständigen Resektionsrändern und bei perineuraler Invasion als adjuvante Therapie eingesetzt werden [18, 28]. Über die Wirksamkeit der Chemotherapie bei fortgeschrittenen SGC ist aufgrund der Seltenheit der Erkrankung wenig bekannt. Insbesondere rezidierte, inoperable sowie fernmetastasierte SGC stellen daher eine große therapeutische Herausforderung dar. Aufgrund dieser unterschiedlichen therapeutischen Ansätze besteht die Notwendigkeit, spezifischere Faktoren für das Therapieansprechen und die Prognose der Patienten zu identifizieren:

In Studien zu anderen Malignomentitäten wurde gezeigt, dass genetische Veränderungen in Tumorsuppressorgen- oder Protoonkogenen Einfluss auf

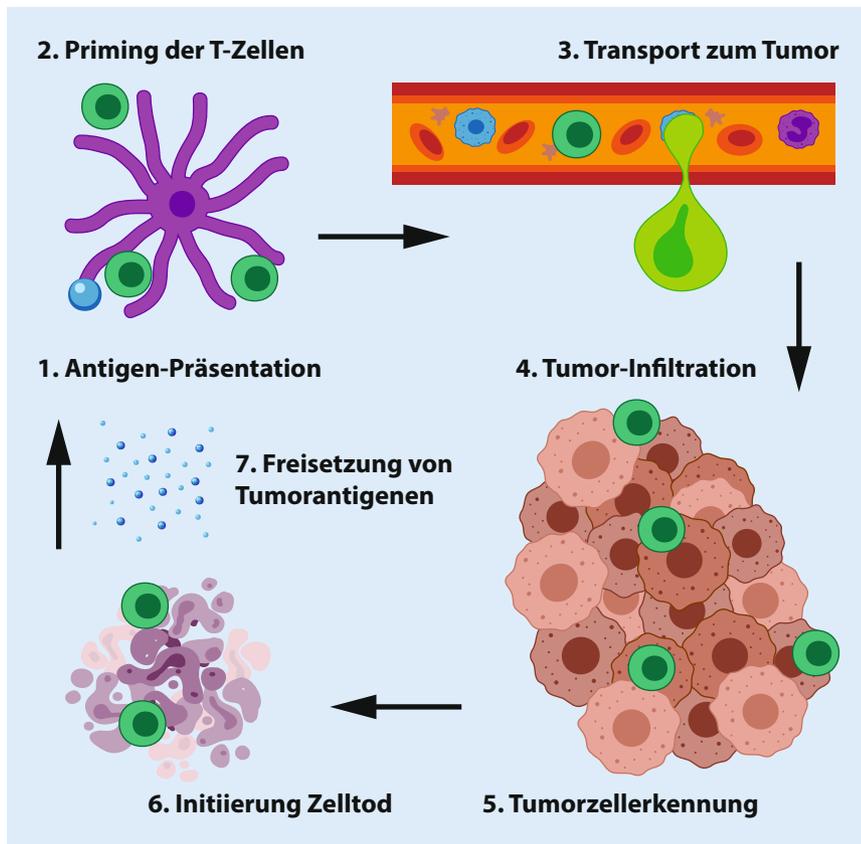


Abb. 1 ▲ Zyklus zur Aktivierung der T-Zell-vermittelten Immunabwehr

Krankheitsverlauf, Prognose und Therapie haben können. Pulmonale Adenokarzinome mit Mutation im *EGFR*-Gen waren sensibler gegenüber einem Tyrosinkinaseinhibitor [11]. Patienten mit Kolonkarzinomen wiesen mit einer Wildtypsequenz im *KRAS*-Gen ein besseres progressionsfreies Überleben bei Kombination der Standardchemotherapie mit einer gegen den EGFR-Rezeptor gerichteten Therapie auf [11]. Grünewald et al. wiesen mittels Next Generation Sequencing (NGS) an 203 Genloci von 46 Genen therapierelevante Mutationen bei SGC nach [11]. Diese NGS-Analyse an 86 SGC bestätigte eine deutliche Prävalenz von Mutationen im p53-Gen [11] sowie ein hohes Vorkommen an HRAS-Mutationen [11]. Eine HER2-Mutation wurde in ersten Studien als wirksamer Therapieansatz bei fortgeschrittenen SDC nachgewiesen [7].

In jüngster Zeit haben tumor- und patientenspezifische molekulare Merkmale wie die Tumormutationslast, die klonale

Neoantigenbelastung, der HLA-Genotyp, die Immunzellinfiltration im TME, die CD8⁺-T-Zell-Aktivierung und die Expression von Immuncheckpointmolekülen in vielen Tumorentitäten an diagnostischer und therapeutischer Relevanz gewonnen [19]. Diese Merkmale werden aktuell in der Therapieselektion intensiv untersucht und mitunter bereits angewendet, um v. a. die Patientengruppen zu identifizieren, die besonders von einer Immuntherapie profitieren. Die Heterogenität der SGC und die bisher limitierten veröffentlichten Untersuchungen stellen die Therapeuten dabei vor besondere Herausforderungen.

Das hier präsentierte Review fasst das Wissen aus bereits erfolgten Studien zum TME der SGC strukturiert zusammen, um so eine Grundlage für ein besseres Verständnis der Zusammenhänge im TME bei Speicheldrüsenkarzinomen zu schaffen. Dafür wurde eine systematische Literaturrecherche über PubMed.gov mit Artikeln in englischer Sprache durchgeführt. Gesucht wur-

de nach den Begriffen „salivary gland carcinoma“, „cancer“, „immunoncology“, „tumor microenvironment“, „PD-1“ und „checkpoint inhibition“. Relevante Artikel, Abstracts und Übersichtsartikel wurden ausgewählt und überprüft. Zudem wurden die Verweise zu den abgerufenen Artikeln auf Relevanz geprüft.

Immunologie im Tumormilieu

Ursachen des zellulären Kontrollverlusts und der konsekutiven malignen Entartung sind genetische Mutationen, Chromosomenanomalien, epigenetische Veränderungen, veränderter Stoffwechsel (Glykolyse bzw. Warburg-Effekt) und reduzierter Sauerstoffgehalt des Gewebes (Hypoxie). Zudem umgehen Tumorzellen den programmierten Zelltod (Apoptose) und reagieren nicht auf inhibitorische Signale, die die unkontrollierte Zellproliferation hemmen.

» Benachbarte nichtmaligne Zellen stehen mit dem Tumor in wechselseitiger Beziehung

Den Tumorzellen unmittelbar benachbart sind nichtmaligne Zellen, die mit dem Tumor in wechselseitiger Beziehung stehen. Diese Zellen können den Tumor in Wachstum und Metastasierung unterstützen oder hemmen. Zu diesen Zellen gehören Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Fettzellen (Adipozyten), Endothelzellen und Zellen des Immunsystems [21]; der gesamte Zellcluster wird als TME bezeichnet.

Die Aktivierung des Immunsystems läuft in mehreren Stufen ab. Der erste Schritt ist die direkte Interaktion zwischen Immunzellen und tumorassoziierten Antigenen (TAA; ■ Abb. 1). Hierbei ist entscheidend, dass entartete Zellen veränderte Gene und somit auch fremdartige Proteine exprimieren, gegen die das Immunsystem versucht, eine Immunantwort aufzubauen. Die Interaktion zwischen TAA und Immunzellen initiiert so die Immunantwort. Der zweite Schritt besteht u. a. in einer spezifischen Antwort, die z. T. durch die Reifung einer stark selektiven Gruppe

von CD8+-T-Lymphozyten gegen TAA charakterisiert ist. Die zuvor „naiven“ CD8+-Lymphozyten reifen nach ihrer Interaktion mit den antigenpräsentierenden Zellen heran. Dieser Schritt wird als „Priming“ bezeichnet ([21]; **Abb. 1**). Im dritten Schritt agieren zytotoxische T-Lymphozyten im Tumormilieu und bekämpfen nach Antigenpräsentation, -identifikation und kostimulatorischen Signalen Tumorzellen direkt [21]. In dieser letzten Phase kann das Tumormilieu die Funktionalität der T-Zellen entscheidend beeinflussen. Durch die Wechselwirkung zwischen PD-1 („programmed cell death protein 1“) auf der Oberfläche von T-Zellen und dem entsprechendem Liganden PD-L1 („programmed cell death ligand protein 1“) auf der Oberfläche von Tumorzellen werden im Tumormilieu inhibitorische Signalwege aktiviert, die eine T-Zell-Anergie zur Folge haben.

Auch tumorassoziierte Neutrophile (TAN) akkumulieren bei Krebspatienten und stellen einen wichtigen prognostischen Marker bei einer Vielzahl von Neoplasien dar. Entsprechend stellen TAN ein hochpotentes therapeutisches Ziel dar, um Tumorangiogenese und Tumorstromawachstum hemmen zu können [22].

Ein weiterer inhibitorischer Signalweg wird über LAG3 („lymphocyte activation gene 3“), einem Korezeptor des T-Zell-Rezeptors, vermittelt. Dieser Rezeptor ist strukturell hochgradig homolog zu CD4 und teilt sich mit diesem seinen Hauptliganden, die Major-Histocompatibility-Complex (MHC)-Klasse II (**Abb. 2**). Aufgrund seiner höheren Affinität als CD4 an MHC-Klasse II [15] hemmt LAG3 somit die CD4/MHC-Klasse-II-Interaktion kompetitiv. Zusätzlich erfolgen inhibitorische Signalwege über seine intrazelluläre Domäne [29]. Bei Melanomen und kolorektalen Karzinomen wird LAG3 vorwiegend auf Forkhead-Box-Protein-P3-positiven regulatorischen T-Zellen (FOXP3+ Tregs) exprimiert, die durch Freisetzung von TGF- β („transforming growth factor- β “) und Interleukin-10 (IL-10) im TME eine immunsuppressive Funktion ausüben [3]. Eine Koexpression von LAG3 und PD-L1 auf TIL („tu-

M. F. Meyer · C. Arolt · B. A. Kansy · J. Doescher · A. Quas · D. Beutner · S. Lang · J. P. Klußmann

Das Tumormikromilieu bei Speicheldrüsenkarzinomen – mögliche Konsequenzen für neue Therapiekonzepte

Zusammenfassung

Hintergrund. Speicheldrüsenkarzinome („salivary gland carcinomas“, SGC) sind seltene Tumoren, die aufgrund ihrer histologischen Vielfalt und den in Abhängigkeit vom Subtyp unterschiedlichen Krankheitsverläufen eine Herausforderung für Diagnostik und Therapie darstellen. Über die Zusammensetzung des Tumormikromilieus (TME) bei SGC ist bislang wenig bekannt. Ein umfassenderes Verständnis der relevanten molekularen Veränderungen und immunologischen Prozesse des Tumors sowie des umgebenden Stromas könnte dazu beitragen, die therapeutische Effizienz – beispielsweise durch eine adjuvante Immunmodulation – zu verbessern.

Methoden. In diesem Manuskript wurden Ergebnisse aus Studien zusammengefasst, die sich mit der Zusammensetzung des TME bei SGC beschäftigen.

Ergebnisse. Das Immuzellinfiltrat der verschiedenen Tumorentitäten ist unterschiedlich. Bei einem Drittel der SGC wurde

eine Expression des Oberflächenzellrezeptors LAG3 („lymphocyte activation gene 3“) auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten beobachtet. LAG3 inhibiert – ähnlich wie CTLA-4 („cytotoxic T-lymphocyte antigen 4“) und PD-1 („programmed cell death 1 protein“) – die zelluläre Proliferation, Aktivierung und Homöostase von antitumoral wirksamen T-Zellen. Höhere Expressionen sind dabei insbesondere bei den prognostisch ungünstigeren Entitäten wie den Speicheldrüsenkarzinomen und Adenokarzinomen NOS („not otherwise specified“) zu beobachten. **Schlussfolgerungen.** LAG3 ist insbesondere bei aggressiven Entitäten und fortgeschrittenen Tumoren nachzuweisen. Folglich könnte eine Therapie mit LAG3-Inhibitoren eine Therapie bei fortgeschrittenen und metastasierten SGC unterstützen.

Tumor microenvironment in salivary gland carcinomas: Consequences for new therapeutic concepts

Abstract

Introduction. Salivary gland carcinomas (SGCs) are rare tumors which represent a challenge for diagnosis and therapy due to their histological diversity and the different disease courses depending on the respective subtype. Little is known about the composition of the tumor microenvironment in SGCs. A more comprehensive understanding of the relevant molecular changes and immunological processes of the tumor and surrounding stroma could help to improve therapeutic efficiency, for example by adjuvant immunomodulation.

Methods. This manuscript highlights recent studies analyzing the composition of the tumor microenvironment in salivary gland carcinomas.

Results. The tumor microenvironment displays a significant diversity in the composition of immune cells among different

tumor entities. In one third of the SGCs, an expression of cell surface molecule LAG3 on tumor infiltrating lymphocytes could be observed. LAG3—similar to CTLA-4 and PD-1—inhibits cellular proliferation, activation, and homeostasis of antitumor-effective T cells. Especially, prognostically less favorable entities such as salivary duct carcinomas and adenocarcinomas NOS (not otherwise specified) yielded higher expressions.

Conclusions. LAG3 is particularly detectable in aggressive entities and advanced tumors. Hence, LAG3 inhibition poses a potential targeted therapy for advanced and metastatic SGCs.

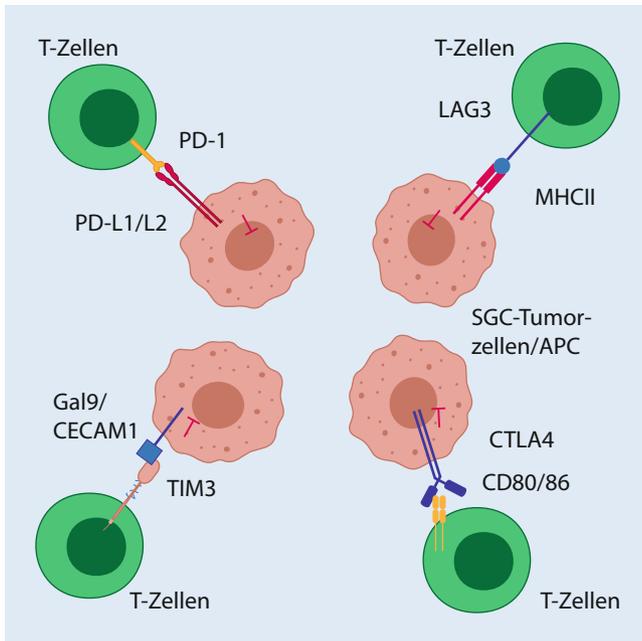


Abb. 2 ▲ T-Zell-Immunantwort, die inhibitorischen Korezeptoren. APC antigen-präsentierende Zellen; *CECAM1* „carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1“; *CTLA-4* „cytotoxic T-lymphocyte antigen 4“; *Gal-9* Galectin-9; *LAG3* „lymphocyte activation gene 3“; *MHC* „major histocompatibility complex“; *PD-L1* „programmed cell death ligand-1“; *PD-L2* „programmed cell death ligand-2“; *PD-1* „programmed cell death 1 protein“; *SGC* Speicheldrüsenkarzinom; *TIM3* „T-cell immunoglobulin and mucin domain 3“

mor-infiltrating lymphocytes“) wurde in mehreren Tumorentitäten menschlichen und murinen Ursprungs beobachtet. Eine gleichzeitige Blockade von LAG3 und PD-L1 mit monoklonalen Antikörpern führte zu einer erhöhten CD4+ und CD8+-TIL-Frequenz und Tumor-Clearance im Vergleich zur Monotherapie in Mausmodellen. Das Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC) und das kolorektale Karzinom mit LAG3-exprimierenden TIL waren mit einem positiven Lymphknotenstatus, einem höheren Tumorstadium und einem kürzeren Gesamtüberleben im Fall eines negativen Lymphknotenstatus bei HNSCC assoziiert [6].

Immunrezeptoren werden im komplexen Zusammenspiel zwischen Tumorzellen und dem Immunsystem exprimiert. Eine Vielzahl an Studien trug zu dem Konzept bei, dass die chronische, tumorzellkontrollierte Entzündung zu einem die Tumorprogression fördernden TME führt [10]. Neben anderen Parametern spielte die Infiltration von

CD8+-T-Lymphozyten und TP53-Mutationen in diesem Zusammenhang eine bedeutende Rolle [10].

» Die chronische, tumorzell-kontrollierte Entzündung führt zu einem die Tumorprogression fördernden TME

In den letzten Jahren haben Medikamente, die T-Zell-Kontrollpunkte wie CTLA-4 und die Achse PD-1/PD-L1 hemmen, eine potente Wirksamkeit durch antitumorale Effekte gezeigt. In Untergruppen von Patienten mit Melanomen, nichtkleinzelligen Lungen-, Nieren-, Blasen- und Urothelkarzinomen führten sie zu einer Verbesserung der Lebensqualität und des Gesamtüberlebens [19]. Bei Kopf-Hals Karzinomen erzielten Anti-PD-1-Therapien bei 15–20% der Patienten eine längerfristige Tumorkontrolle [9]. Bei SGC gibt es bisher hingegen nur wenige Daten zur

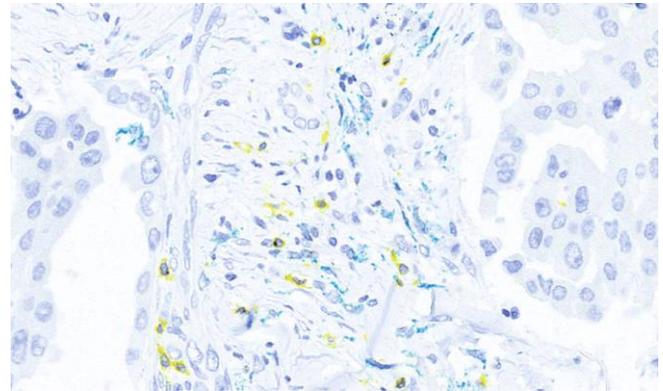


Abb. 3 ▲ Darstellung eines Speicheldrüsenkarzinoms, 3-farbige immunhistochemische Färbung. LAG3 schwarz, CD8 gelb (CD8+-T-Zellen), CD68 türkisfarben (Makrophagen). Koexpression von LAG3 und CD8, jedoch keine Koexpression von LAG3 und CD68. Dreifachfärbungen mit automatisiertem Färbesystem Ventana Discovery Ultra (Fa. Roche, Schweiz) durchgeführt. Verwendung folgender Primärantikörper: Kaninchen-anti-LAG3-IgG-monoklonaler Antikörper D2G40 (Fa. Cell Signaling Technology, Niederlande; Verdünnung 1:300), monoklonaler Maus-anti-CD8-Antikörper C8/144B (Fa. Dako/Agilent, USA; Verdünnung 1:200), monoklonaler Maus-anti-CD68-Antikörper PG-M1 (Fa. Dako/Agilent, USA; Verdünnung 1:400), monoklonaler Maus-anti-FOXP3-Antikörper 236A/E7 (Fa. Abcam, UK; Verdünnung 1:100), monoklonaler Kaninchen-anti-CD4-Antikörper 4B12 (Fa. Roche, Schweiz, gebrauchsfertig). Nach Konjugation mit einem Antikörpergebundenen Enzym (Meerrettichperoxidase oder alkalische Phosphatase) Durchführung des Nachweises mit DISCOVERY Silver kit (LAG3), DISCOVERY Yellow kit (FOXP3, CD8), DISCOVERY Teal kit (CD68), DISCOVERY Red Kit (CD4, alle Ventana/Roche, Schweiz). Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Bläuungsreagenz durchgeführt (Vergrößerung 40:1)

Wirksamkeit der Immuncheckpointinhibition im Hinblick auf das Gesamtüberleben und eine Verbesserung der Lebensqualität [7]. Neben den bereits beschriebenen Checkpointinhibitoren PD-1, CTLA-4 und LAG3 lassen sich weitere Checkpoints im TME nachweisen, wie TIGIT („T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains“), VISTA („V-domain Ig suppressor of T-cell activation“) und TIM3 („T-cell immunoglobulin and mucin domain 3“), welche an der Interaktion des Immunsystems mit dem Tumor beteiligt sind.

Die Komposition des TME ist bei Speicheldrüsenmalignomen eng mit dem jeweiligen histologischen Subtyp assoziiert [19]. Über alle SGC hinweg war das Ausmaß der Immuninfiltration mit mutierten und fusionierten Neoantigenen sowie mit aggressivem klinischem Verhalten assoziiert [19]. Im Folgenden soll die Expression wichtiger Checkpoint-Signalwege in Abhängigkeit von der histologischen Entität dargestellt werden. Eine Übersicht hinsichtlich der LAG3-Expres-

Tab. 1 Expression wichtiger Checkpoint-Signalwege in Abhängigkeit von der histologischen Entität

Tumorentität	LAG3-Expression	Level	Klinisch-pathologische Korrelationen	Nachweis
Speichelgangkarzinom	TIL	Hoch	Immunogen, auch PD-1, CTLA-4, PD-L2 mit hoher Expression in TIL bzw. Tumor	[1, 4, 19, 27, 30]
Adenoidzystisches Karzinom	TIL	Niedrig	TME eher supprimiert, PD-1 nur gering nachzuweisen, PD-1/PD-L2-Achse scheint relevant	[1, 17, 20, 25, 27]
Mukoepidermoidkarzinom	TIL	Niedrig	Hohe Expression von PD-1/PD-L1 in Tumor und TIL	[1, 14, 27]
Epithelial-myoepitheliales Karzinom	TIL	Niedrig/hoch	Heterogen, ein Phänotyp mit hoher Immunogenität und ein Phänotyp mit geringer Immunogenität können unterschieden werden	[1, 19, 27]
Adenokarzinom NOS	TIL	Hoch	PD-1/PD-L1-Expression auf Tumor und TIL niedrig	[1, 27]
Azinuszellkarzinom	Unbekannt	Unbekannt	PD-1/PD-L1-Expression auf Tumor und TIL niedrig	[27]

TIL „tumor-infiltrating lymphocytes“; LAG3 „lymphocyte activation gene 3“; PD-1 „programmed cell death 1 protein“; CTLA-4 „cytotoxic T lymphocyte antigen 4“; PD-L1/2 „programmed death ligand 1/2“; NOS „not otherwise specified“; TME Tumormikromilieu

sion und PD-1/PD-L1/L2 in den histologischen Subgruppen der SGC wurde in **Tab. 1** zusammengestellt.

Speichelgangkarzinom

Linxweiler et al. zeigten, dass SDC im Vergleich zu anderen SGC-Entitäten hohe Mutationslasten („tumor mutational burden“, TMB) und massive T-Zell-Dysfunktionen aufweisen [19].

Diese Ergebnisse decken sich mit weiteren Studien, die Veränderungen des TME bei SDC deutlich häufiger als bei anderen Tumorentitäten der SGC aufzeigen [30]. Auch die Expression von PD-1 in Immunzellen im TME ist im Vergleich zu anderen SGC-Entitäten erhöht. Zudem wies das TME einen hohen Anteil an TIL auf [27]. SDC mit positiver PD-1-Expression waren mit einer signifikant schlechteren Prognose (Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben) assoziiert [27]. Auch PD-L2 und CTLA-4 wurden auf SGC-Tumorzellen mit einer Häufigkeit von 63 % bzw. 74,1 % deutlich häufiger exprimiert als in anderen SGC-Entitäten. Eine erhöhte PD-L2-Expression war mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben vergesellschaftet [4]. Arolt et al. belegten eine Positivität für LAG3 bei 66,7 % von 8 untersuchten Tumoren ([1]; **Abb. 3**).

Adenoidzystisches Karzinom

ACC zeigten in einer Studie von Linxweiler ein supprimiertes Immunsystem im TME. Charakteristisch waren das Vorhandensein von M2-polarisierten Ma-

krophagen und myeloischen Suppressorzellen sowie einer geringen TMB [19].

Musconi et al. kamen bei Auswertung von 36 ACC zum Schluss, dass diese niedrige CD8+, GrB+-TIL-, CD1a- und CD83-Populationen sowie eine geringe Positivität für CTLA-4 und PD-1 aufwies [20]. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Vital et al., denen der Nachweis einer geringen Expression von PD-1 in Tumorzellen und TIL (jeweils 8 % bzw. 3 %) gelang [27]. Im Gegensatz dazu waren die PD-L2- und HLA-G-Expression erhöht, eine PD-L1-Expression war nicht nachzuweisen. Fälle mit niedrigerer CD8+-TIL-Dichte wiesen höhere Rezidivraten auf [20]. Musconi et al. schließen daraus, dass beim TME des ACC eine geringe Immunogenität besteht, die durch eine niedrige Dichte an TIL und dendritischen Zellen repräsentiert wird. Darüber hinaus scheint eine Aktivierung der immunhemmenden Proteine PD-L2 und HLA-G zu existieren, eine Konstellation, die den „immune escape“ des Tumors begünstigen und die ungünstige Prognose des ACC teilweise erklären könnte [20]. Diese Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen von Jeske et al.: Eine immunhistochemische Analyse des TME von 10 Patienten zeigte vorrangig einen „Infiltrated-excluded-Typ“, bei dem die Immunzellen (insbesondere zytotoxische T-Zellen) am Rand des Tumors verbleiben und das Tumorgewebe nicht direkt infiltrierten [17].

Sridhahran et al. (2016) untersuchten Gewebe aus 28 primären sowie metastatischen ACC von 21 Patienten auf die Infiltration von Immunzellen sowie die

PD-L1-/PD-L2-Expression und ermittelten mRNA-Profile von über 1400 Onkogenen und immunverwandten Genen [25]: Sowohl der Primärtumor als auch die Metastasen enthielten eine Vielzahl infiltrierender Immunzellen (>100/HPF, Hauptgesichtsfeld). Kein Patient präsentierte eine gesteigerte Expression von PD-L1 auf Tumorzellen. Im Gegensatz dazu ließ sich in 50 % (7/14) der primären und 38 % (3/8) der Lymphknotenmetastasen eine PD-1-Positivität von Immunzellen im TME nachweisen. PD-L2 wurde hingegen auf 60 % der primären (9/15) und 73 % (8/11) der Lymphknotenmetastasen exprimiert. Somit könnte die PD-1/PD-L2-Achse eine bedeutendere regulatorische Funktion bei Patienten mit ACC haben als die PD-L1-vermittelten Signalwege.

Arolt et al. gelang der Nachweis einer LAG3-Positivität bei 20,7 % der Patienten ($n = 29$). CD8+-Zellen zeigten sich bei insgesamt 13,8 % der Patienten. In der entitätsbezogenen Analyse korrelierte die LAG3-Positivität mit einem verminderten progressionsfreien Überleben bei ACC [1].

Mukoepidermoidkarzinom

Vital et al. wiesen eine Expression von PD-1 in 25 % der Tumorzellen und 36 % der tumorinfiltrierenden Immunzellen bei insgesamt 36 untersuchten MEC nach [27]. In einer weiteren Studie zu Patienten mit MEC ließ sich bei 63,6 % der Tumoren eine Expression von PD-1 nachweisen [14]. Beide Studien belegten

eine höhere PD-1-Expressionsrate bei MEC als bei anderen SGC-Entitäten.

Arolt et al. berichteten über eine LAG3-Positivität bei lediglich 18,5 % der Patienten. Dies entspricht neben dem epithelial-myoeptitheliales Karzinom der niedrigsten LAG3-Expressionsrate aller SGC. Die CD8+-Inflammation zeigte sich hingegen mit 25,9 % im Vergleich zu anderen Entitäten hoch [1].

Epithelial-myoeptitheliales Karzinom

In einer Studie von Linxweiler et al. wurden 40 epithelial-myoeptitheliale Karzinome (EMC) hinsichtlich der Immuninfiltration der Tumoren untersucht. Die EMC waren heterogen und konnten in einen immun-niedrigen und einen immun-hohen Phänotyp unterteilt werden [19]. Im Vergleich zu ACC und SDC zeigten EMC sowohl für die Immuninfiltration als auch für TMB niedrige Werte. Zudem wurde berichtet, dass die Immuncheckpointrezeptoren bei EMC im Vergleich zu ACC und SGC eher erniedrigt waren: Signifikante Unterschiede bestanden insbesondere in der Expression von PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3 („T-cell immunoglobulin and mucin domain 3“) und TIGIT („T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains“), welche weitere Immuncheckpoints darstellen [19]. Auch Vital et al. zeigten PD-1-Expressionen von 0 % im Tumor und 18 % in tumorinfiltrierenden Immunzellen in insgesamt 10 Tumoren [27].

Adenokarzinom not otherwise specified

Mit einer PD-1-Expression von 17 % der Patienten im Tumor und 33 % der Patienten in den TIL [27] war die Expression von PD-1-/PD-L1 im Vergleich zu anderen Entitäten der SGC niedrig. Dies könnte auf eine niedrigere Relevanz der PD-1-/PD-L1-Achse hinsichtlich der Tumorgenese bei Adenokarzinomen „not otherwise specified“ (AD-NOS) hindeuten.

Demgegenüber zeigen AD-NOS mit 50 % im Vergleich zu anderen SGC-Entitäten eine hohe LAG3-Expression ($n = 19$). Auch der CD8+-Anteil erschien

mit knapp 50 % im Vergleich zu anderen SGC-Entitäten hoch [1]. Weitere Informationen über das TME bei AD-NOS fehlen bisher in der Literatur.

Azinuszellkarzinom

Aufgrund des langsamen Wachstums, der geringen Wahrscheinlichkeit von Metastasen und der damit verbundenen guten Prognose sind Untersuchungen zum TME der Azinuszellkarzinome rar. Vital et al. zeigten an 30 Tumoren eine geringe PD-1-Expression im Tumor (13 %) und in den tumorinfiltrierenden Immunzellen (20 %) [27].

Seltenere Entitäten

Die bisher nicht aufgezählten Entitäten sind derart selten, dass bisher wenig valide Informationen vorhanden sind. Sie repräsentieren insgesamt nur einen Anteil von unter 20 % der SGC.

Diskussion

Im Folgenden wird die Umsetzung in die Praxis erörtert und die Frage nach möglichen Konsequenzen für die Therapie gestellt. Die KEYNOTE-028-Basket-Studie zu PD-L1-positiven Tumoren beinhaltete eine SGC-Kohorte von 28 Patienten, die eine Therapie mit Pembrolizumab (Merck Sharp & Dohme, Kenilworth, New Jersey, USA) erhielten. In dieser Studie wurden 26 Patienten mit PD-L1-positivem SGC behandelt; das mittlere Alter betrug 57 Jahre, 88 % waren Männer, 74 % hatten zuvor eine Therapie wegen rezidivierender bzw. metastasierender Krankheit erhalten. Das objektive Therapieansprechen nach der medianen Nachbeobachtung von 20 Monaten betrug 12 %, wobei 3 Patienten ein partielles Therapieansprechen erreichten; es gab keinen Patienten mit einer vollständigen Remission. Die mediane Dauer des Therapieansprechens betrug 4 Monate [5].

Auf der ASCO 2019 wurden 3 Studien vorgestellt, die sich mit der Wirksamkeit von Immuncheckpointinhibitoren bei SGC beschäftigten: In allen 3 Studien wurde jeweils eine geringe Ansprechrate bei Patienten mit ACC und allen anderen SGC-Entitäten beobachtet [7].

Lediglich die Subgruppe der Patienten mit ACC wies eine höhere Rate des progressionsfreien Überlebens auf.

Den primären Endpunkt des progressionsfreien Überlebens erreichten 33 % der ACC-Patienten nach 6 Monaten [8]. Insgesamt weisen die Ergebnisse zur PD1-Inhibition bei SGC (ACC und Nicht-ACC) darauf hin, dass die Therapie aufgrund der geringen Ansprechraten nicht hinreichend wirksam ist. Größer angelegte Studien mit einer höheren Fallzahl an Patienten könnten hier Klarheit bringen.

Neben den bisher in der EU zugelassenen und in der Klinik am meisten angewendeten PD-1/PD-L1-Checkpointinhibitoren befinden sich weitere Checkpointinhibitoren wie CTLA-4 und LAG3-Inhibitoren in Zulassungsverfahren. Mehrere potenzielle Mechanismen der Immunsuppression könnten für ACC geprüft werden, darunter die PD-L2- und die LAG3-Inhibition als Einzeltherapie oder in Kombination mit Chemotherapie und/oder Bestrahlung.

Auch die LAG3-Positivität der prognostisch schlechteren Entitäten SDC und AC-NOS könnten in Zukunft Ansatzpunkte für eine effektive Immuntherapie bieten. In palliativer Therapieindikation können SDC derzeit bereits in 2 klinische Studien eingeschlossen werden: Hierbei wird die Wirksamkeit einer LAG3-Blockade entweder als alleinige Therapie oder in Kombination mit Nivolumab (Bristol Myers Squibb, New York, New York, USA) untersucht (NCT01968109, NCT02720068). Für die SDC und AD-NOS sind neue Ansätze für zielgerichtete Therapien gerechtfertigt: Während ein Teil der SDC eine Amplifikation des *ERBB2*-Gens zeigten und bei diesen Patienten neuere klinische Studien mit Trastuzumab (Roche Holding AG, Basel, Schweiz) positive Ergebnisse lieferten, ist die Ansprechdauer in einer Vielzahl von Fällen begrenzt [26]. Im Gegensatz dazu fehlen bei AD-NOS prävalente onkogene Mutationen, sodass Checkpointinhibitoren die einzige aktuell mögliche zusätzliche therapeutische Option darstellen [1]. Zusammen mit bereits vorgestellten Studienergebnissen zur Beurteilung der PD-L1-/L2-Expression in SGC [4, 14] deuten die

Ergebnisse von Arolt et al. darauf hin, dass die Hemmung der inhibitorischen Checkpoints eine Option für eine systemische Therapie bei fortgeschrittenen und metastasierten SGC sein könnten [1].

Limitationen

Für die hier dargestellte Zusammenfassung ist es wichtig, kritisch zu erwähnen, dass es histologische Überschneidungen zwischen SDC und AD-NOS gibt. In der Vergangenheit wurden viele Tumoren mit kribriiformer bis mikropapillärer Differenzierung dem AD-NOS zu geordnet, die nun mit heutiger besserer Kenntnis über genomische Alterationen als SDC klassifiziert werden. Der Nachweis einer Androgen- und HER2/neu-Rezeptor-Expression sowie ERB2-Amplifikation, PIK3CA- oder TP53-Mutation hilft aktuell bei der Differenzierung zwischen AD-NOS und SDC. Viele ehemals als AD-NOS klassifizierte Tumoren sind nach neuen Erkenntnissen SDC. Älteres AD-NOS-Gewebe sollten für neuere Untersuchungen reevaluiert und reklassifiziert werden, da ansonsten die Gefahr besteht, dass einige Untersuchungsergebnisse fälschlich der Gruppe der AD-NOS zugeordnet werden und nicht den SDC.

Als weitere Limitation des Reviews ist zu nennen, dass bei der Zusammenfassung Informationen über Besonderheiten und Therapieziele des Tumorgewebes, insbesondere die genomischen Besonderheiten und Signalwege, nicht dargestellt und diskutiert wurden. Auch typische Mutationen und Translokationen können potenzielle Ziele für eine wirksame Immuntherapie sein. Insbesondere Tumoren mit HER2-Amplifikationen stellen aktuell bereits eine therapierbare Gruppe von SGC dar [26]. Als wichtigster Vertreter der SGC ist hier das Speichelgangkarzinom zu nennen. Insbesondere bei den SDC gilt die Überexpression von HER2/neu als unabhängiger prognostischer Faktor für ein reduziertes krankheitsspezifisches und fernmetastasenfreies Überleben [12]. Trastuzumab bindet an den HER2-Rezeptor, der bei HER2-Amplifikation in deutlich höherer Anzahl auf der Tumor-

zellmembran nachweisbar ist. Durch die Bindung von Trastuzumab kommt es zur Aktivierung einer komplexen Signalkaskade: Hierzu zählen der Arrest des Zellzyklus der Tumorzelle in der G1-Phase, die Hemmung der Angiogenese, die Hemmung des DNA-Reparatursystems und die Aktivierung des Immunsystems. Als Antikörper bezieht Trastuzumab das Immunsystem in die Tumorbekämpfung mit ein. Auf ihrer Zelloberfläche exprimieren natürliche Killerzellen (NK) Fc γ -Rezeptoren. Durch die Bindung an die Fc-Domäne von Trastuzumab werden folglich auch NK-Zellen aktiviert mit konsekutiver Lyse von HER2-positiven Zellen, die Trastuzumab gebunden haben [26]. Dieser Vorgang wird als antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität bezeichnet.

Ausblick

Des Weiteren besteht für Tumoren mit einer Neurotrophe-Tyrosinrezeptorkinase (NTRK)-Genfusion eine tumorunabhängige Zulassung zur Behandlung mit Tropomyosinrezeptorkinasen (TRK) durch die Europäische Kommission. Insbesondere bei den sekretorischen mammanalogen SGC, die durch eine ETV6-NTRK3-Fusion charakterisiert sind [16], könnte eine Therapie mit Larotrectinib (Bayer, Leverkusen, Deutschland) als TRK-Inhibitor tumorizide Wirkung zeigen. Studien zu SGC stehen bisher noch aus.

Um die Relevanz der immuntherapeutischen Optionen zu spezifizieren, müssen zukünftige Studien im größeren, multizentrischen Rahmen durchgeführt werden. Insbesondere für aggressive, rezidierte und fortgeschrittene SGC kann die Immuntherapie eine vielversprechende ergänzende Therapieoption darstellen. Die Klärung des Einflusses der Radiotherapie auf die Expression von Checkpointinhibitoren steht noch aus. Zirkulierende lösliche Mengen von LAG3 oder TIM3 im Patientenserum oder intrazelluläre Checkpointinhibitor-Spiegel könnten als diagnostische Indikatoren untersucht werden.

Fazit für die Praxis

- Das Tumormikromilieu (TME) variiert bei den Speicheldrüsenkarzinomen (SGC).
- Es sollte hinsichtlich seiner Rezeptoren und Immunzellen untersucht und mit dem Therapieansprechen korreliert werden.
- Die Untersuchung der Expression weiterer Rezeptoren im TME wie TIGIT („T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains“), VISTA („V-domain Ig suppressor of T-cell activation“) und TIM3 („T-cell immunoglobulin and mucin domain 3“) ist sinnvoll.
- Therapeutisch haben PD-1-Checkpointinhibitoren bisher in Studien mit geringer Fallzahl bei palliativen SGC-Patienten kaum Wirkung gezeigt.
- Bei Speichelgangkarzinomen (SDC) werden Checkpointrezeptoren auf Immunzellen in hoher Prozentzahl exprimiert.
- LAG3 und PD-L2-Inhibitionen könnten v. a. bei prognostisch ungünstigen SGC wie SDC und Adenokarzinomen „not otherwise specified“ (AD-NOS) wirksam sein.

Korrespondenzadresse



PD Dr. M. F. Meyer

Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen, Hufelandstraße 55, 45147 Essen, Deutschland
moritz.meyer@uk-essen.de

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. M.F. Meyer: Advisory Board: MSD und BMS. Doescher J: Advisory Board: MSD. C. Arolt, B. A. Kansy, J. Doescher, A. Quaas, D. Beutner, S. Lang und J. P. Klußmann geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Für diesen Beitrag wurden von den Autoren keine Studien an Menschen oder Tieren durchgeführt. Für die aufgeführten Studien gelten die jeweils dort angegebenen ethischen Richtlinien.

Literatur

1. Arolt C, Meyer M, Ruesseler V et al (2020) Lymphocyte activation gene 3 (LAG3) protein expression on tumor-infiltrating lymphocytes in aggressive and TP53-mutated salivary gland carcinomas. *Cancer Immunol Immunother*. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02551-6>
2. Büchsenstschütz K, Veit JA, Schuler PJ et al (2014) Molecular approaches to systemic therapy of adenoid cystic carcinoma of the head and neck area. *Laryngorhinootologie* 93:657–664
3. Camisaschi C, Casati C, Rini F et al (2010) LAG-3 expression defines a subset of CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells that are expanded at tumor sites. *J Immunol* 184:6545–6551
4. Chang H, Kim JS, Choi YJ et al (2017) Overexpression of PD-L2 is associated with shorter relapse-free survival in patients with malignant salivary gland tumors. *OncoTargets Ther* 10:2983–2992
5. Cohen RB, Delord JP, Doi T et al (2018) Pembrolizumab for the treatment of advanced salivary gland carcinoma: findings of the phase 1b KEYNOTE-028 study. *Am J Clin Oncol*. <https://doi.org/10.1097/COC.0000000000000429>
6. Deng WW, Mao L, Yu GT et al (2016) LAG-3 confers poor prognosis and its blockade reshapes antitumor response in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Immunology* 5:e1239005
7. Doescher J, Schuler PJ, Greve J et al (2019) Salivary gland malignancies—highlights of the 2019 ASCO Annual Meeting. *HNO* 67:931–934
8. Fayette J, Even C, Digue L et al (2019) NISCAHN: A phase II, multicenter nonrandomized trial aiming at evaluating nivolumab (N) in two cohorts of patients (pts) with recurrent/metastatic (R/M) salivary gland carcinoma of the head and neck (SGCHN), on behalf of the Unicancer Head & Neck Group. *J Clin Oncol* 37:6083
9. Ferris R, Gillison ML (2017) Nivolumab for squamous-cell cancer of head and neck. *N Engl J Med* 376:596
10. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140:883–899
11. Grünewald I, Vollbrecht C, Meinrath J et al (2015) Targeted next generation sequencing of parotid gland cancer uncovers genetic heterogeneity. *Oncotarget* 6:18224–18237
12. Haderlein M, Scherl C, Semrau S et al (2017) Impact of postoperative radiotherapy and HER2/new overexpression in salivary duct carcinoma. *Strahlenther Onkol* 193:961–970
13. Haller F, Bieg M, Will R et al (2019) Enhancer hijacking activates oncogenic transcription factor NR4A3 in acinic cell carcinomas of the salivary glands. *Nat Commun* 10:368
14. Harada K, Ferdous T, Ueyama K (2018) PD-L1 expression in malignant salivary gland tumors. *BMCCancer* 18:156
15. Huard B, Prigent P, Tournier M et al (1995) CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins. *Eur J Immunol* 25:2718–2721
16. Hung YP, Jo VY, Hornick JL (2019) Immunohistochemistry with pan-TRK antibody distinguishes secretory carcinoma of the salivary gland from acinic cell carcinoma. *Histopathology* 75:54–62
17. Jeske SS, Weissinger SE, Veit JA et al (2019) Treatment induced changes of lymphocyte subsets in patients with adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 276:1465–1473
18. Lang S, Rotter N, Lorenzen A et al (2005) Salivary gland carcinomas Part II. Diagnosis and therapy. *HNO* 53:905–911
19. Linxweiler M, Kuo F, Katabi N et al (2020) The immune microenvironment and neoantigen landscape of aggressive salivary gland carcinomas differ by subtype. *Clin Cancer Res*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-3758>
20. Mosconi C, de Arruda JAA, de Farias ACR et al (2019) Immune microenvironment and evasion mechanisms in adenoid cystic carcinomas of salivary glands. *Oral Oncol* 88:95–101
21. Perri F, Ionna F, Longo F et al (2020) Immune response against head and neck cancer: biological mechanisms and implication on therapy. *Transl Oncol* 13:262–274
22. Pylaeva E, Harati MD, Spyra I et al (2019) NAMPT signaling is critical for the proangiogenic activity of tumor-associated neutrophils. *Int J Cancer* 144:136–149
23. Schmitt NC, Kang H, Sharma A (2017) Salivary duct carcinoma: An aggressive salivary gland malignancy with opportunities for targeted therapy. *Oral Oncol* 74:40–48
24. Skálová A, Stenman G, Simpson RHW et al (2018) The role of molecular testing in the differential diagnosis of salivary gland carcinomas. *Am J Surg Pathol* 42:e11–27
25. Sridharan V, Gjini E, Liao X et al (2016) Immune profiling of adenoid cystic carcinoma: PD-L2 expression and associations with tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer Immunol Res* 4:679–687
26. Takahashi H, Tada Y, Saitome T et al (2019) Phase II trial of trastuzumab and docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive salivary duct carcinoma. *J Clin Oncol* 37:125–134
27. Vital D, Ikenberg K, Moch H et al (2019) The expression of PD-L1 in salivary gland carcinomas. *Sci Rep* 9:12724
28. Wang X, Luo Y, Li M et al (2017) Management of salivary gland carcinomas—a review. *Oncotarget* 8:3946–3395
29. Workman CJ, Dugger KJ, Vignali DAA (2002) Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3. *J Immunol* 169:5392–5395
30. Xu B, Jungbluth AA, Frosina D et al (2019) The immune microenvironment and expression of PD-L1, PD-1, PRAME and MHC I in salivary duct carcinoma. *Histopathology* 75:672–682