

A tumort infiltráló immunsejtek prognosztikai értéke melanómában

Ladányi Andrea

Országos Onkológiai Intézet, Sebészi és Molekuláris Patológiai Osztály, Budapest

A szolid daganatok szerves részét képező gazdaszervezeti sejtek, ezen belül a veleszületett és adaptív immunválasz létrehozásában közreműködő sejtek pozitív és negatív hatást is gyakorolhatnak a betegség kimenetelére. A daganatkiújulás esélyét csökkentő hatékony adaptív immunválasz létrejöttében kulcsszerepet játszó T-limfocita-alcsoportok és antigénprezentáló dendritikus sejtek infiltrációja általában kedvező prognózissal jár együtt. A tumorprogressziót elősegítő krónikus gyulladásos folyamatokban fontos szerepet játszó tumorasszociált makrofágok, hízósejtek és neutrofil granulociták akkumulációja ezzel szemben többnyire kedvezőtlen kórjósító tényező. Melanóma esetén a limfoid infiltrátum, illetve ezen belül a T-sejtek prognosztikai szerepének tanulmányozása ellentmondásos eredménnyel járt. Munkacsoportunk vizsgálatai szerint az aktivált T-limfociták denzitása azonban korrelált a betegek túlélésével, s hasonló eredményt kaptunk a B-sejtek, valamint az érett dendritikus sejtek esetében is. Mind a dendritikus sejtek, mind a B-limfociták mennyisége korrelációt mutatott az aktivált T-sejtek számával, s kombinációban történő vizsgálatuk révén eltérő prognózisú betegcsoportokat tudtunk megkülönböztetni. Más kutatócsoportok tanulmányai alapján a neutrofil granulociták intenzív infiltrációja rövidebb túléléssel volt kapcsolatba hozható, míg a makrofágok és egyéb sejtípusok prognosztikai szerepének feltárására irányuló vizsgálatokból nem vonható le egyértelmű következtetés. Eredményeink arra utalnak, hogy a hatékony tumorellesztő immunválasz létrejöttében kulcsfontosságú antigénprezentáló dendritikus sejtek, valamint a B-, illetve az aktivált T-limfociták emelkedett mennyisége a malignus melanóma kedvező prognosztikai tényezőjeként értékelhető. Magyar Onkológia 57:85-95, 2013

Kulcsszavak: melanóma, tumorinfiltráló immunsejtek, limfociták, dendritikus sejtek, prognózis

Host cells representing an integral component of solid tumors, among them cells contributing to the development of native and adaptive immune responses, can exert both positive and negative effects on the outcome of the disease. Infiltration of T lymphocyte subsets and antigen presenting dendritic cells, crucial in mounting an efficient antitumor immune response, is generally associated with favorable prognosis. On the contrary, accumulation of tumor-associated macrophages, mast cells and neutrophils, playing important roles in chronic inflammatory processes promoting tumor progression, predicts unfavorable disease outcome in most cases. In melanoma, studies on the prognostic impact of the lymphoid infiltrate in general, and that of T cells, yielded controversial results. In our studies, density of activated T lymphocytes correlated with patients' survival, and we obtained similar results in the case of B cells and mature dendritic cells. The amount of both B cells and dendritic cells showed correlation with that of activated T lymphocytes, and their combined analysis identified patient subgroups with different prognosis. According to data from the literature, intense infiltration by neutrophil granulocytes could be associated with shorter survival, while no unambiguous conclusions can be drawn from studies on the prognostic value of tumor-associated macrophages and other immune cell types. Our results indicate that a prominent infiltration of dendritic cells, B cells and activated T lymphocytes can be considered as a favorable prognostic factor in malignant melanoma.

Ladányi A. Prognostic value of tumor-infiltrating immune cells in melanoma. Hungarian Oncology 57:85-95, 2013

Keywords: melanoma, tumor-infiltrating immune cells, lymphocytes, dendritic cells, prognosis

Levelezési cím: Dr. Ladányi Andrea, Országos Onkológiai Intézet,
1122 Budapest, Ráth Gy. u. 7-9. Tel.: 224-8600/1155, fax: 224-8706, e-mail: ladanyi@oncol.hu

A munka az OTKA 72836 sz. grant támogatásával készült.

Közlésre érkezett: 2013. január 15. • Elfogadva: 2013. április 3.

BEVEZETÉS

A bőr malignus melanómáját a legimmunogénebb daganatok között tartják számon. Más szolid tumorokhoz hasonlóan gyakran tartalmaz jelentős mennyiségű immunsejtet, mely a gazdaszervezetnek a tumor elleni immunreakcióját tükrözheti. A daganatok progressziója azonban sokszor a jelentős limfoid infiltráció, vagy akár dokumentálható immunválasz jelenlétében is végbemegy, ami arra utal, hogy az immunrendszer nem képes a tumornövekedés megfékezésére. Ennek hátterében többféle, egymást nem kizáró mechanizmus állhat. Amennyiben nem megfelelő szintű a tumorantigének vagy a hatékony prezentálásukhoz szükséges molekulák kifejeződése, úgy az ezeket az antigéneket felismerő T-limfociták szuboptimális aktiválódása vagy válaszképtelensége következtében nem alakul ki immunreakció a daganat ellen. Optimális T-sejt-aktiváció esetében is problémát okozhat, ha a megfelelő kemokinek vagy kemokinreceptorok hiánya miatt ezek a sejtek „nem találják oda” a tumor által érintett területekre. Végül, sok esetben a tumor területén gátolt az immuneffektor funkció a tumorsejtek vagy más, a környezetükben levő gazdaszervezeti sejtek által termelt immungátló anyagok, illetve szuppresszor sejtek hatása következtében (1–3).

Az utóbbi 1-2 évtizedben az is világhosszá vált, hogy az immunrendszer sejtjei nemcsak tumorelles, hanem a daganatok növekedését serkentő hatást is kifejthetnek, például a tumorokhoz társuló gyulladásos folyamatok kialakulásában, illetve fenntartásában játszott szerepük révén. A krónikus gyulladás a rákkelvezés régóta ismert kockázati tényezője, de a nem gyulladás talaján kialakuló daganatok esetében is elősegíti a tumorprogressziót (4–6). A T-limfociták mellett a daganatokban legnagyobb mennyiségben előforduló immunsejtek, a makrofágok kulcsfontosságú komponensei a folyamatoknak. Bár rendelkeznek antigénprezentáló funkcióval és – megfelelően aktivált állapotban – tumorsejttől hatást is kifejthetnek, a tumorasszociált makrofágok (TAM) esetében inkább a daganatok növekedését és progresszióját elősegítő hatás dominál, növekedési és proangiogenetikus faktorok, citokinek, illetve immunszuppresszív anyagok kibocsátása útján (7–11). Hasonló hatást írtak le neutrofil granulociták és hízósejtek esetében is (10, 12–15).

A limfoid infiltrátum jelenléte (a limfocita-alcsoportok megkülönböztetése nélkül), illetve a T-sejtes infiltráció intenzitása számos tumortípus esetében a betegség kedvező kimenetelével mutatott korrelációt (16). Egy vastag- és végbélrákon végzett, igen nagy esetszámot (több mint 600 beteg) magába foglaló vizsgálatban a tumorsejtszigeteket infiltráló, illetve azokat körülvevő CD8⁺ (citotoxikus) és CD45RO⁺ (memória) T-sejtek mennyisége alapján nyert „immunpontszám” erősebb prognosztikus tényezőnek bizonyult, mint a hagyományos

TNM-stádium (17, 18). Ezen eredmények alapján fontolóra vették a tumort infiltráló T-sejtek meghatározásán alapuló immunpontszám bevezetését a stádium meghatározásának gyakorlatába vastag- és végbélrákok esetében, illetve vizsgálatok elindítását az egyéb daganattípusokban való alkalmazhatóság meghatározására (19, 20). A T-limfociták mellett a dendritikus sejtek – a leghatékonyabb antigénprezentáló sejtek – száma is a legtöbb szolid tumor esetében összefüggést mutatott a túléléssel. Ezzel szemben a tumorasszociált makrofágok fokozott infiltrációja általában kedvezőtlen prognosztikus tényezőnek mutatkozott.

Majd egy évtizeddel ezelőtt a Magyar Onkológiában összefoglaltam az addig publikált jelentősebb eredményeket a daganatok infiltráló immunsejtek prognosztikai jelentőségéről (21). A jelen tanulmányban a bőr malignus melanómájára összpontosítva ismertetem a vonatkozó irodalmi adatokat, ezen belül saját vizsgálataink eredményét.

A PRIMER MELANÓMÁT INFILTRÁLÓ EGYES IMMUNSEJT TÍPUSOK PROGNOSZTIKAI JELENTŐSÉGE

Limfociták

Melanóma esetében a legtöbb vizsgálatban a tumorinfiltráló limfociták (TIL) jelenlétét a sejt típus szerinti megkülönböztetés nélkül, hematoxilin-eozin-festés alapján határozták meg, prognosztikai értékükre nézve meglehetősen ellentmondásos eredménnyel (22). Több, nagy betegszámra támaszkodó tanulmány szerint az erőteljes limfoid infiltráció jó prognózisa utaló független paraméter (23, 24), mások azonban nem találtak szignifikáns összefüggést, vagy a limfoid infiltráció nem független prognosztikai markernek bizonyult (25–27). Clark (28), illetve Clemente (29) javasolták, hogy csak a tumor ún. vertikális növekedési fázisát (VGP) infiltráló limfocitákat vegyék figyelembe, amit független kedvező prognosztikai paraméternek találtak. Más, hasonló metodikát alkalmazó kutatások azonban ezt nem erősítették meg (30–32). Egy feltételezés szerint (31) az ellentmondás hátterében az állhat, hogy a TIL túlélésre gyakorolt hatása jobban érvényesül előrehaladottabb melanómák esetében, minthogy a pozitív eredményt mutató tanulmányokban jellemzően az esetek többségét az 1,7, illetve 2 mm-nél vastagabb daganatok tették ki, míg a negatív eredménnyel zárulóknál a vékonyabb tumorok domináltak. Néhány olyan vizsgálatban, amely a túléléssel nem mutatott szignifikáns összefüggést, a tumorinfiltráló limfociták hiánya az őrszemnyirokcsomó-pozitivitás független prediktorának bizonyult (31, 32), nem volt azonban különbség sem a helyi, sem a távoli kiújulás gyakoriságában, ami magyarázhatja a túléléssel való kapcsolat hiányát (31).

T-limfociták

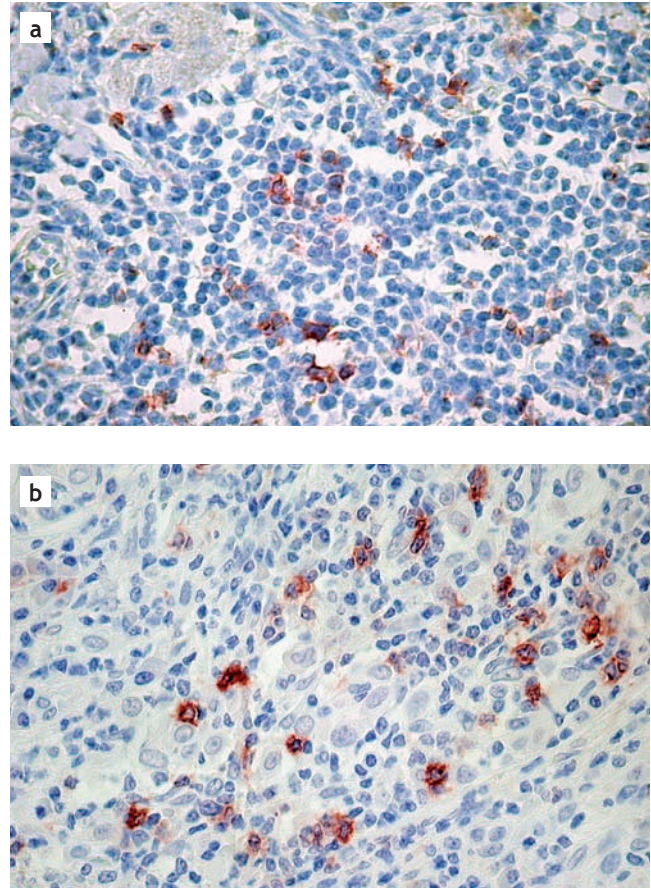
A daganatok elleni immunválaszban elsődlegesnek tekintett sejtközvetített immunválasz „főszereplői” a T-limfociták. Tumorantigéneket felismerő CD4⁺ (helper – segítő) és CD8⁺ (citotoxikus – sejtölő) T-sejtek egyaránt izolálhatók a legtöbb szolid daganatot infiltráló limfocitákból. A helper T-sejtek az általuk kibocsátott citokinek alapján több altípusba sorolhatók, melyek közül a legtöbb adat a Th1, Th2 és Th17 irányú polarizációt mutató limfocitákról ismert. A – többek között – IL-2, IL-12 és IFN- γ termelésével jellemezhető Th1 típusú reakció elősegíti a vírus- és tumorelles immunválaszt. Az IL-4, IL-5, IL-10 és IL-13 szekréciójával jellemzett Th2-polarizált sejtek inkább az ellenanyag-közvetített immunválasz kialakulásában játszanak szerepet, a daganatok elleni védekezés szempontjából az eddigi adatok szerint negatív hatásúak. Az – egyéb citokinek mellett – nagy mennyiségű IL-17-et termelő Th17 sejtek szerepéről ellentmondásos eredmények láttak napvilágot. Az említett Th-sejttípusok nem rendelkeznek specifikus, az immunhisztokémiai elkülönítést lehetővé tevő markerekkel, ezért vizsgáltuk az általuk termelt citokinek, illetve ezek géneexpressziós szintjének kimutatása alapján végezhető.

A T-limfociták, illetve egyes alcsoportjaik (pl. CD8⁺, CD45RO⁺) infiltrációja számos ráktípusnál pozitív prognosztikus tényezőnek bizonyult (16), melanóma esetében azonban csak kevés, többnyire kis esetszámmal magába foglaló és egymásnak meglehetősen ellentmondó tanulmány készült. Két kisebb vizsgálatban (47, illetve 35 beteg) a betegek túlélése pozitív korrelációt mutatott a CD8⁺, illetve CD4⁺ T-limfociták tumoron belüli mennyiségével (33, 34), egy harmadikban (58 beteg) viszont fordított korrelációt találtak az intratumorális CD3⁺ T-sejtek infiltrációjával, míg CD8⁺ limfociták esetében nem volt összefüggés a túléléssel (35). A T-sejtek peritumorális sűrűségét nem vizsgálták, vagy nem találtak prognosztikai jelentőségűnek. Egy nagyobb esetszámmal tanulmány (186 beteg) szerint nincs összefüggés a túlélés és a CD8⁺ T-limfociták intra- vagy peritumorális denzitása között (36). Munkacsoportunk (52 tumormintán végzett) vizsgálatai szerint a CD3⁺ és CD8⁺ T-sejtek peritumorális száma, különösen a vastagabb melanómák esetében pozitív korrelációt mutatott a mikroérdenzitással, és valamivel alacsonyabb volt a szervi áttétet képző daganatok esetében, de a túléléssel nem találtunk szignifikáns összefüggést (37). A tumor területén meghatározott Th-polarizációs mintázat prognosztikai összefüggéseit melanóma esetében nem vizsgáltuk.

Aktívált T-sejtek

A tumorinfiltráló T-sejtek sokszor funkcionálisan sérültek, proliferációs, citokintermelési, illetve citotoxicitási képességük csökkent (2, 3). Fontos ezért, hogy prognosztikai

1. ábra. CD25⁺ (a), illetve CD134⁺ (b) limfociták melanóma infiltrátumában (magfestés: kék; CD25, illetve CD134: piros színreakció)



kai szerepük megítélésakor a T-sejtek, illetve alcsoportjaik mennyiségi meghatározása mellett e sejtek funkcionális és aktiváltsági állapotát is jellemezzük. A melanómát infiltráló T-limfociták prognosztikai szerepét elemző tanulmányok ellentmondásos, de inkább negatív eredménye háttérben – a viszonylag kis esetszám mellett – az is állhat, hogy a T-sejtekre, illetve alcsoportjaikra specifikus antitestekre alapuló metodika következtében nem vették tekintetbe e sejtek potenciálisan csökkent funkcionális aktivitását. Kutatócsoportunk vizsgálataiban a T-limfociták aktiváltsági állapotának lemerésére alkalmas aktivációs markerek közül kettőt alkalmaztunk, a CD25-öt (IL-2-receptor- α) és a CD134-et (OX40). Mindkettő funkcionális szempontból is jelentős; előbbi a sejtosztódás szabályozásában játszik kiemelten fontos szerepet, míg az utóbbi kostimulációs receptor. Az aktivációs markereket hordozó limfociták nagyobb részben a peritumorális infiltrátumban fordultak elő, de a melanóma-sejtfészkeken belül is megtalálhatóak voltak (1. ábra). Magas peritumorális denzitásuk kedvező

prognózissal járt együtt, s a CD134⁺ sejtek száma a túlélés független prediktorának bizonyult (21, 38). Egy későbbi, kisebb esetszámú vizsgálatban (35 beteg) összefüggést találtak a citotoxikus aktivitásra utaló granzim B-t expresszáló CD8⁺ T-limfociták intratumorális megjelenése és a betegség kedvező kimenetele között (34).

Regulátor T-sejtek

A daganatok elleni immunválasz gátlásában szerepet játszó potenciális szuppresszor-sejt-típusok közül a legjobban jellemzettek a CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulátor T-sejtek (Treg). Az ún. természetes Treg-sejtek a timuszban jönnek létre, míg az adaptív Treg-sejtek a perifériás szövetekben aktiváció hatására alakulnak ki CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ sejtekből. A regulátor T-sejtek alapvető fontosságúak az autoimmun folyamatok kialakulásának megelőzésében, és jelentős szerepet tulajdonítanak nekik a tumorelles immunfolyamatok gátlásában is. Emelkedett mennyiségben találhatók rákbetegek vérében egészséges kontrollokhoz viszonyítva, és számos daganattípus esetében a tumorszövetben való felhalmozódásukat is megfigyelték (39). Prognosztikai hatásuk azonban ellentmondásos, nagymértékben függ a tumorok típusától; míg bizonyos rákok esetében a magas Treg-szám a betegség kedvezőtlen kimenetelét jelezte, más daganatokban ezzel ellenkezőleg, kedvező prognózissal járt, s ismét más esetekben nem találtak semmilyen összefüggést (16, 40). E vizsgálatok túlnyomó többsége a FOXP3 transzkripció faktor elleni antitesteket alkalmazta a Treg-sejtek jelölésére, mely – bár nem teljesen Treg-specifikus, minthogy aktiváció hatására átmenetileg kifejeződik mind CD4⁺, mind CD8⁺ T-limfocitákon – jelenleg a legjobb és leginkább használt markernek tekinthető.

Melanómás betegek tumormintáit infiltráló regulátor T-sejtek számának elemzésével csak néhány munkacsoport foglalkozott. Az egyik, csak vertikális növekedési fázissal rendelkező daganatokra kiterjedő tanulmányban (66 beteg) a Treg-sejtek mennyisége nagyobb volt a később lokális recidívát adó esetekben, a túléléssel való összefüggést azonban nem vizsgálták (41). Egy másik tanulmányban (58 beteg) nem volt szignifikáns korreláció a betegek túlélésével (35). Saját, 97 beteg tumormintáján végzett vizsgálatunkban sem találtunk összefüggést sem a túléléssel, sem más klinikopatológiai paraméterrel (42).

NK- és NKT-sejtek

Az NK-sejtek (natural killer, természetes ölősejtek) a veszélytett immunitás effektor sejteiként fontos szerepet játszanak a vírusfertőzött és tumorsejtek elpusztításában, melynek fő mechanizmusa a perforin/granzim-, illetve halálreceptor-közvetített citotoxicitás (43). A dendritikus sejtekkel való kölcsönhatásaik révén részt vesznek az adaptív

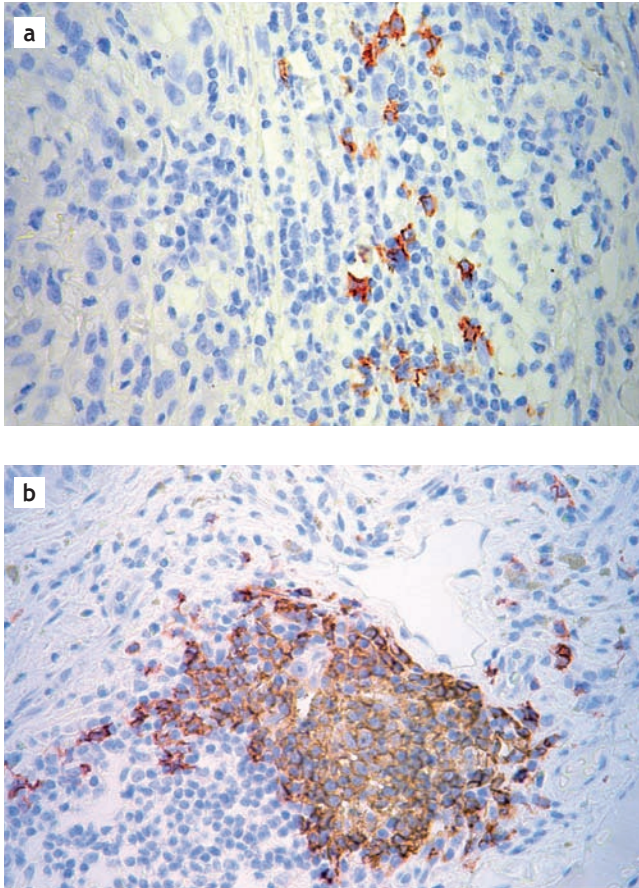
immunreakciók szabályozásában is (44). Aktiváltsági állapotukat az aktiváló (NKG2D, DNAM-1, NKp30, NKp44, NKp46, stb.), illetve a gátló (a „killer cell immunoglobulin-like receptors” – KIR család egyes tagjai, CD94/NKG2A, stb.) receptoraikon keresztül elindított jelpályák egyensúlya határozza meg. A szolid daganatokban általában kis mennyiségben találhatók meg; feltételezhetően elsősorban a szisztémás védekezésben, a hematogén áttétek kialakulásának megelőzésében játszhatnak szerepet. A daganatokat infiltráló NK-sejteket továbbá sok esetben az aktiváló receptorok csökkent expressziója, valamint csökkent funkcionális aktivitás jellemzi (45–47). Ennek hátterében a tumorsejtek, illetve a környező stromális sejtek által termelt immunosuppresszív anyagok (pl. TGF- β , IL-10, PGE2, IDO) hatása feltételezhető, melyet melanóma esetén is leírtak (43, 48, 49). Ennek ellenére a daganatokban az NK-sejtek emelkedett száma több tumortípus esetén a betegség kedvező kimenetelével járt együtt (16, 47). Meg kell azonban jegyezni, hogy e vizsgálatok nagy részében a CD56, illetve CD57 markereket alkalmazták, amelyek az NK-sejtek mellett más sejt-típusokon is kifejeződnek; csak a legutóbbi időben kezd elterjedni a specifikusabbnak tartott NKp46 marker használata (46). Melanóma esetében, bár jelenlétük a melanociták léziók környezetében dokumentálható (50, 51), az NK-sejtek prognosztikai jelentőségét még nem vizsgálták.

Az NKT-sejtek NK-sejtekre jellemző markerek (pl. CD56) mellett a T-limfociták markereit, többek között a CD3-at és a klasszikus ($\alpha\beta$) T-sejt-receptort (TCR) is expresszálják. Egyik alcsoportjukat, az invariáns NKT-sejteket (iNKT) ezen belül a Va24-es TCR alfa-lánc kifejeződése jellemzi. Az NK-sejtekhez hasonlóan daganatokban kis mennyiségben fordulnak elő, és prognosztikai szerepüket csak néhány tanulmány elemzi (16).

B-limfociták

Néhány daganattípustól eltekintve a B-limfociták általában viszonylag kis mennyiségben fordulnak elő a szolid tumorokban. Kérdéses az antitest-közvetített immunitás szerepe a daganatok elleni immunválasz létrehozásában, illetve a szisztémás B-sejt-aktivitás vagy a tumoros szövetekben e sejtek felhalmozódásának hatása a daganatok viselkedésére. Egyes állatkísérletes modellekben a B-limfociták tumornövekedést vagy -progressziót fokozó hatására derült fény (52, 53), más kísérletek azonban ezzel ellentétes eredményre vezettek (54). Az ellentmondó eredmények hátterében a B-sejtek funkcionális diverzitása állhat (55). A termelt ellenanyagok vagy az immunkomplexek révén potenciálisan elősegíthetik a tumornövekedést és egyéb immuninhibitor faktorokat is termelhetnek. Másrészt azonban a B-limfociták hatékony antigénprezentáló sejtekként is

2. ábra. CD20⁺ B-sejtek elszórtan (a), illetve aggregátumokban csoportosultan (b) melanóma infiltrátumában (magfestés: kék; CD20: piros színreakció)



működhetnek, ezáltal segítve a daganatellenes T-sejt-válasz létrejöttét.

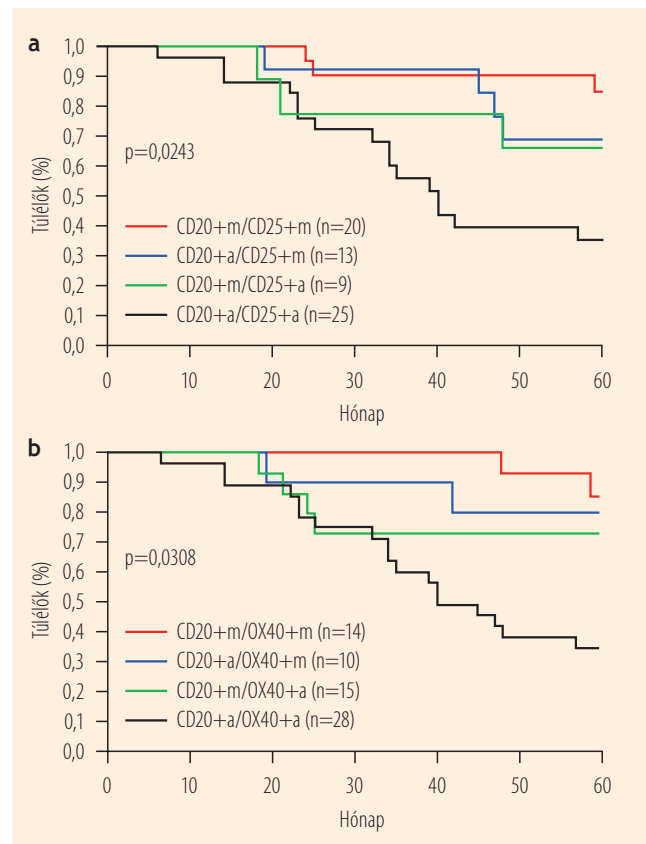
Hasonlóan a legtöbb tumortípushoz, a melanómák infiltrátumát is a T-limfociták dominanciája jellemzi, és a korai, többnyire kis elemszámon alapuló tanulmányok a B-sejtek hiányáról vagy igen ritka jelenlétéről számoltak be (56, 57). Újabb keletű vizsgálatok azonban a B-limfociták jelenlétét igazolták primer melanómákban, bár kétségtelenül a T-sejteknél kisebb mennyiségben, az összes limfocita ~15-20%-át képviselve (35, 58). E tanulmányok eredményével összhangban, 106 melanómás beteg primer tumorából származó minták nagy részében jelentős mennyiségű B-sejtet mutatunk ki a CD20 marker elleni antitestet alkalmazó immunhisztokémiai technikával (59). A B-limfociták túlnyomó többsége a tumorstrómában helyezkedik el, nagyrészt elszórtan, de a minták kb. egynegyedében follikulusszerű, denz aggregátumok is megfigyelhetők voltak (2. ábra). A B-sejtek denzitása korrelált az aktivált (CD25⁺, CD134⁺) T-limfocitáival. A melanómákban az erős B-sejtes in-

filtráció szignifikáns prognosztikai előnyt jelentett, míg a túlélésnek a B- és aktivált T-limfociták mennyiségének kombinációja alapján történő elemzése szerint az alacsony B- és egyidejűleg alacsony aktivált T-sejt-denitású esetek prognózisa kirívóan rossz volt (3. ábra). A CD20⁺/CD134⁺ kombináció a daganatvastagság mellett a túlélés független prediktorának bizonyult (59). Egy korábbi, kisebb elemszámú vizsgálatban az infiltráló B-sejtek mennyiségét nem találták szignifikáns prognosztikai tényezőnek (35).

Dendritikus sejtek

A dendritikus sejtek (DC), mint a leghatékonyabb antigén-prezentáló sejtek, a tumorantigének feldolgozása és a CD4⁺ és CD8⁺ T-limfociták számára való találása révén kulcsfontosságúak a daganatellenes immunválasz létrejöttében. Fenotípus, anatómiai lokalizáció és funkciók szempontjából heterogén sejtekből álló komplex rendszert alkotnak (60). A Langerhans-sejtek a bőr és nyálkahártyák mieloid eredetű DC-i, melyeket az ún. Birbeck-granulomok jelenléte és a CD1a, Langerin,

3. ábra. Melanómás betegek Kaplan-Meier túlélési görbéje a B-sejtek és az aktivált T-sejtek mennyiségének együttes elemzése alapján. a) CD25⁺, b) CD134⁺; m: magas denzitas, a: alacsony denzitas (59)



valamint E-cadherin markerek expressziója jellemez (60, 61). A szintén mieloid eredetű intersticiális DC-k (a bőrben a dermális DC-knek felelnek meg) CD1b és CD1c, valamint részben CD1a és faktor XIIIa markereket fejeznek ki (60, 61). A dendritikus sejtek harmadik alcsoportja, a plazmacitoid DC-k eredete (mieloid vagy limfoid) még vitatott; jellemző markereik a CD123 (IL-3R α) és a CD303 (BDCA-2) (60).

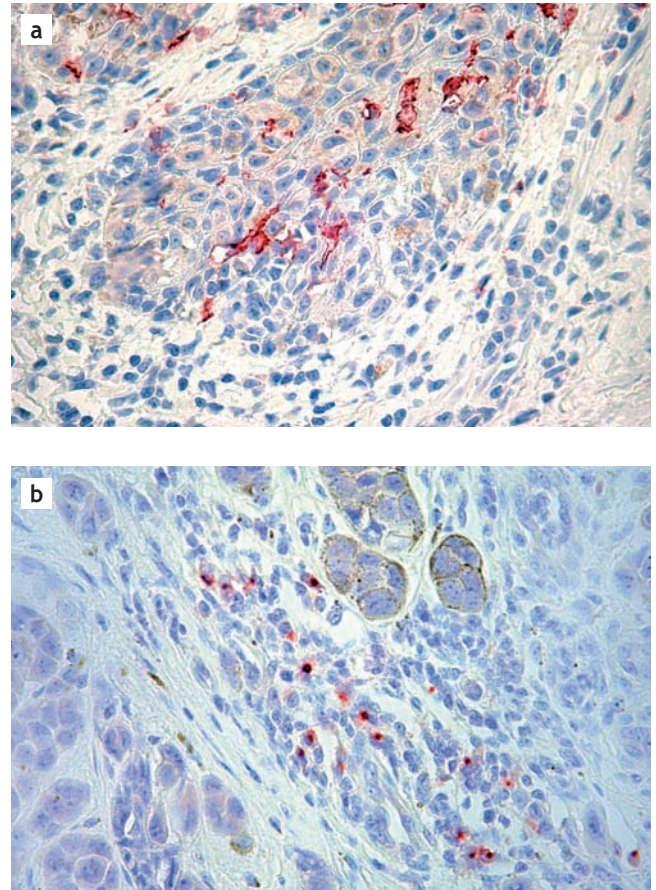
Az antigénnel való találkozás, valamint citokinek és gyulladásos mediátorok hatására a dendritikus sejtek érési folyamaton mennek keresztül, melynek eredményeként fokozódik a felszínükön az antigénprezentációhoz szükséges MHC és a kostimulációs molekulák expressziója, így képesek hatékonyan stimulálni a nyirokcsomókban az általuk prezentált antigént felismerő T-limfocitákat. Éretlen vagy nem teljesen érett állapotban azonban toleranciát idézhetnek elő, amit melanómás betegek esetében is leírtak (62). Az érett DC-kre emellett jellemző a CD83 és CD208 (DC-LAMP) markerek kifejeződése is.

A tumorelles immunválasz kialakulásában játszott fontos szerepüknek megfelelően a dendritikus sejtek fokozott infiltrációja a legtöbb daganattípus esetében pozitív korrelációt mutatott a betegek túlélésével (16). Melanómán elsőként, 82 beteg tumormintáján végzett vizsgálatunkban (63) kimutattuk, hogy a CD1a⁺ dendritikus sejtek mind a tumorsejtfészkekben belül, mind a strómában megtalálhatóak, míg a DC-LAMP⁺ érett DC-k jelenléte általában a peritumorális területekre korlátozódik, a limfoid infiltrátumhoz kapcsolódva (4. ábra). Mindkét marker esetén a jelölt sejtek mennyisége a tumorvastagsággal erős fordított korrelációt mutatott, a betegek túlélésével való összefüggés azonban az érett dendritikus sejtek esetében kifejezettebb volt. A DC-LAMP⁺ DC-k és a túlélés kapcsolatát egy későbbi, 186 beteg anyagát magába foglaló tanulmány megerősítette (36).

Hasonlóan a B-limfocitákhoz, a dendritikus sejtek denzitása is korrelációt mutatott az aktivált T-sejtekével. A CD1a⁺, illetve DC-LAMP⁺ DC-k és a CD25⁺, illetve CD134⁺ T-limfociták mennyiségének együttes elemzése az egyidejű magas DC- és aktivált T-sejtdenzitású eseteknek a többi csoporthoz viszonyított kedvező kimenetelét igazolta (5. ábra). A DC-LAMP⁺/CD134⁺ kombináció a Breslow-index mellett a túlélés független prediktorának bizonyult (63).

A daganatok infiltrátumában plazmacitoid DC-k is megtalálhatóak, melyek antigénprezentáló funkciójuk mellett I-es típusú interferonok termelése révén is segíthetik a T-, illetve NK-sejtek aktiválását (64), azonban a tumorok környezetében található pDC-k egyes feltételezések szerint inkább immunsuppresszív hatásúak (65). Hasonlóan néhány, más tumortípuson történt tanulmány eredményéhez, egy 186 primer melanómán történt vizsgálatban magas denzitásukat a betegség kedvezőtlen kimenetelét előrejelző prognosztikus faktornak találták (36).

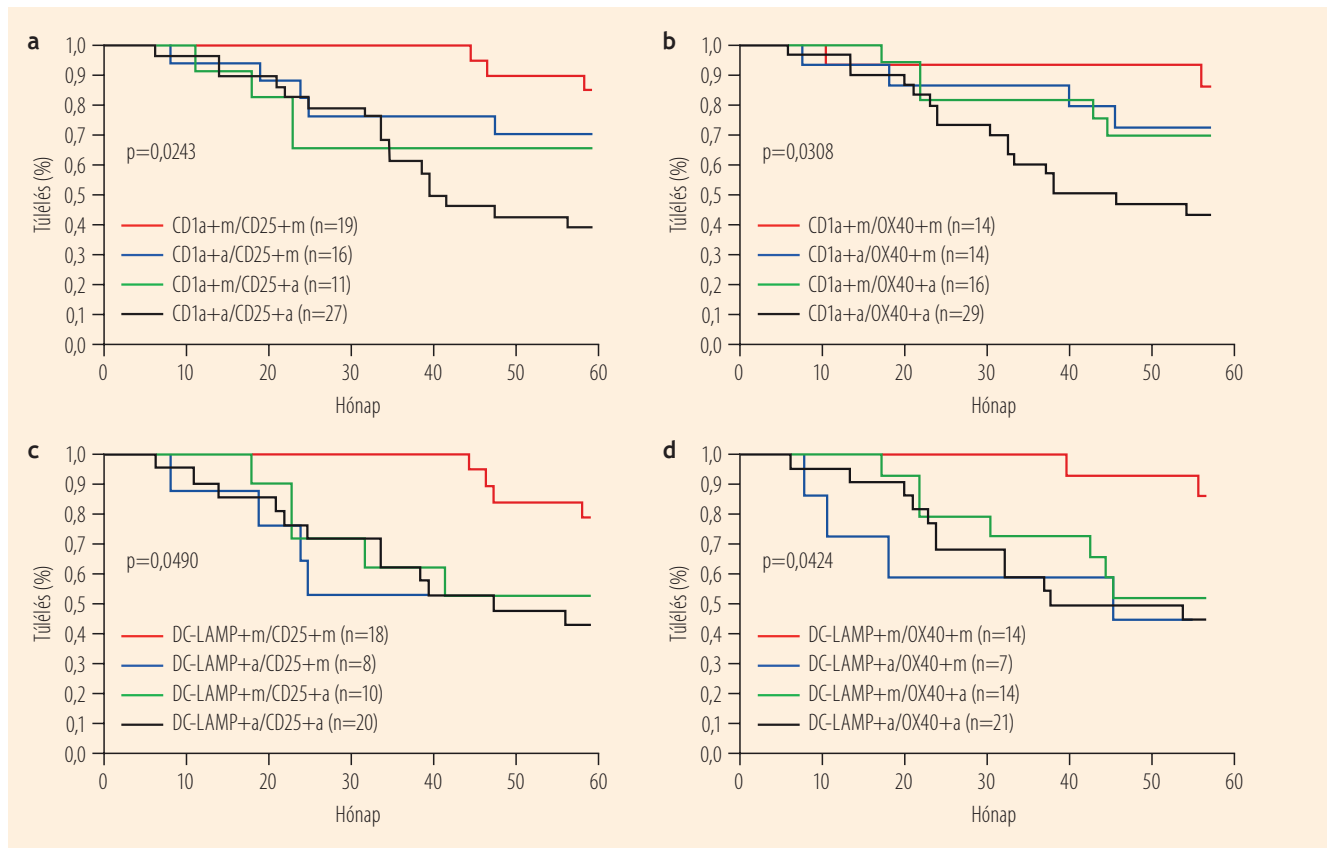
4. ábra. CD1a⁺ dendritikus sejtek (a), illetve lizoszomális DC-LAMP-festődést mutató érett dendritikus sejtek (b) melanómában (magfestés: kék; CD1a, DC-LAMP: piros színreakció)



Makrofágok

A tumorokat nagy számban infiltráló makrofágok fontos szerepet játszanak a daganatok környezetében gyakran előforduló gyulladásos folyamatok kialakulásában és fenntartásában. A keringő monocitákból származó, igen heterogén sejtcsoportot alkotó makrofágok az őket érő stimulusok természetétől függően különböző funkcionális sajátosságokkal rendelkezhetnek. Az IFN- γ , illetve mikrobiális eredetű anyagok (pl. LPS) által, ún. klasszikus módon aktivált (M1) makrofágok IL-12 és IL-23 termelése révén az I-es típusú T-sejt-választ (Th1) aktiválják, jó antigénprezentáló képességgel rendelkeznek, és hatékonyan közreműködnek a vírus- és mikrobiális fertőzések, valamint a daganatok elleni immunvédekezésben. Antigénprezentáló funkciójuk mellett közvetlen tumorsejtölő hatást is kifejthetnek különböző toxikus anyagok termelésén keresztül (pl. TNF- α , NO, reaktív oxigénintermedierek) (7, 8, 66). Az alternatív úton, pl. IL-14, IL-10, IL-13 vagy immunkomplexek

5. ábra. Melanómás betegek Kaplan-Meier túlélési görbéje a dendritikus sejtek és az aktivált T-sejtek mennyiségének együttes elemzése alapján. a) CD1a⁺/CD25⁺, b) CD1a⁺/CD134⁺, c) DC-LAMP⁺/CD25⁺, d) DC-LAMP⁺/CD134⁺; m: magas denzitás, a: alacsony denzitás (63)



által aktivált (M2) makrofágok ezzel szemben IL-12 helyett inkább IL-10-et és bizonyos kemokineket termelnek, antigénprezentáló képességük gyenge, inkább a sejtörmelékeket eltávolító (scavenger), a károsodott szöveteket újraépítő és angiogenezist stimuláló funkciójuk áll előtérben (7, 8, 11, 66). A T-sejtek polarizációjában a Th2 és Treg irányú differenciációt segítik elő, mely serkenti a B-sejtek ellenanyag-termelését, azonban gátolja a CD8⁺ T- és az NK-sejt-aktivitást. Az egyszerűsítő M1 és M2 beosztás a makrofágok funkcionális aktivitása széles spektrumának végpontjait jelenti, melyek között folyamatos az átmenet. A jelenleg domináló nézet szerint a tumorasszociált makrofágok az M2 típushoz állnak közelebb, a daganatok területén, illetve mikrokörnyezetében expresszálódó, az M2 irányú polarizációnak kedvező faktorok hatása következtében (7–9, 11, 66). Különböző növekedési faktorok, citokinek (pl. EGF, bFGF, VEGF, TGF- β , PDGF, TNF- α , IL-8) termelésével a tumornövekedést stimulálhatják közvetlenül, illetve közvetve, az angiogenezis serkentésével (8, 10, 11, 67). Az extracelluláris mátrixot bontó enzimek, valamint citokinek és kemokinek kibocsátása útján elősegítik

a tumorsejtek migrációját, invázióját és áttétképzését (7–9, 11). Immunszuppresszív faktorok (pl. TGF- β , IL-10, PGE2), valamint az elsődlegesen a citotoxikus aktivitást nem mutató T-limfocita-altípusokat (pl. Th2, Treg) vonzó kemokinek termelése révén pedig gátolhatják a tumorellenes T-sejtes immunválasz kialakulását (7–9, 11).

A fent említett, inkább a daganatok növekedése és progressziója irányába ható aktivitásuk ismeretében nem meglepő, hogy a tumorasszociált makrofágok fokozott infiltrációja a legtöbb daganatféléseknél kedvezőtlen prognosztikus tényezőnek bizonyult (16). Melanómában néhány korábbi, viszonylag kisebb esetszámú (47, 51, illetve 58 beteg) tanulmány – köztük saját vizsgálatunk – nem írt le szignifikáns összefüggést a betegek túlélésével (33, 35, 37). Jensen és mtsai nagyobb beteganyagot (190 eset) magába foglaló vizsgálata szerint a CD68⁺ makrofágok nagy mennyisége az invazív frontnál, illetve az M2 típusra jellemző CD163 markert hordozó makrofágok emelkedett stromális denzitása kedvezőtlen prognosztikai faktornak adódott (68). Egy másik, hasonlóan nagy esetszámú vizsgálat (202 beteg) ugyanakkor nem tárt fel szignifikáns korrelációt a makrofágszám

és a túlélés között, bár összefüggést talált egyes, kedvezőtlen prognosztikai tényezőként ismert klinikopatológiai paraméterekkel, mint a tumorstagság és az ulceráció (69). Néhány más daganattípushoz hasonlóan, a makrofágok mennyisége ez utóbbi tanulmány eredménye szerint arányos volt a daganatok érdenzítésével; saját vizsgálatunkban szignifikáns korrelációt csak a 4 mm-nél vastagabb melanómák csoportjában találtunk (37).

Granulociták és hízósejtek

A makrofágok mellett a neutrofil granulociták is fontos szereplői a daganatokhoz társuló gyulladásos folyamatoknak. A makrofágokhoz hasonlóan, a mikrokörnyezeti tényezők hatására különböző fenotípussal és funkcionális aktivitással rendelkező formáik alakulnak ki (12, 13). Az M1/M2 polarizáció analógiájára bevezetett N1/N2 tipizálásra vonatkozóan egyelőre csak állatkísérletes adatok vannak, és feltételezik, hogy – a makrofágoktól eltérően – a két típus nem alternatív aktiváció hatására alakul ki, hanem különböző aktivációs szinteknek felelnek meg (N1: erősen aktivált, N2: mérsékelten aktivált). További hasonlóság a makrofágokhoz, hogy – bár aktivált állapotban képesek a malignus sejtek elpusztítására citotoxikus mediátorok termelése útján – a tumorasszociált neutrofilek (TAN) hatásában is a daganatok progressziója irányába mutató folyamatok dominálnak. Termelnek például a tumornövekedést közvetlenül vagy az érképződés serkentésén keresztül fokozó anyagokat (pl. IL-8, VEGF, TNF- α), mátrixbontó proteázokat (neutrofil elasztáz, MMP-k), elősegítve az inváziót és áttétképzést (10, 12, 13). Ennek megfelelően, az eddig vizsgált daganattípusokban a neutrofil granulociták jelenléte általában rossz prognózist vetített előre (16). Melanóma esetében is hasonló eredményre vezetett Jensen és mtsai 186 betegen végzett, a CD66b marker kimutatásán alapuló vizsgálata (36).

Az eozinofil granulociták jelenléte a tumorban ezzel szemben többnyire kedvező prognózissal járt együtt (16), így daganatellenes hatásukat feltételezik az általuk termelt citotoxikus anyagok közvetítésével, illetve más effektor sejtek aktiválásán keresztül, a pontos mechanizmus(ok) azonban nem ismert(ek). Prognosztikai jelentőségüket melanómás betegek esetén nem vizsgálták, előfordulásuk ebben a tumortípusban ritka.

A bazofil granulociták infiltrációja a daganatokra nem jellemző. A hasonló tulajdonságokkal rendelkező, szintén hematopoetikus progenitorokból kialakuló, de szöveti elhelyezkedésű hízósejtek ezzel szemben gyakran megtalálhatók a tumorok környezetében, és fontos szerepet játszanak a gyulladásos- és immunfolyamatok szabályozásában. Multifunkcionális sejttypusként a daganatokra gyakorolt hatásaik is sokrétűek. Citotoxikus molekulák kibocsátásával, illetve közvetve, antigénprezentáló sejtekként vagy

más immunsejtek stimulálása útján képesek a tumorsejtek elpusztítására. Ugyanakkor növekedési faktorok, citokinek termelésével közvetlenül, vagy a krónikus gyulladás kialakulásának, illetve fenntartásának előmozdítása révén serkenthetik is a daganatok növekedését. Emellett számos angiogén faktort, citokint és mátrixbontó enzimet is termelnek, melyek révén fokozzák a daganatok érképződését, invázióját és áttétképzését (10, 14, 15).

A hízósejtek infiltrációjának prognosztikai szerepéről nyert adatok ellentmondásosak (14–16). Számos tanulmány szerint mennyiségük összefüggött a daganatok progressziójával, valamint korrelációt mutatott a tumorok érdenzítésével, más esetekben azonban a betegség kedvező kimenetelével találtak kapcsolatot. Primer melanóma esetében több, de viszonylag kis beteganyagon végzett vizsgálatot végeztek. Schadendorf és mtsai (44 beteg) nem találtak összefüggést a tumort körülvevő hízósejtek mennyisége és a daganat vastagsága, illetve a betegség kimenetele között (70). Tóth és mtsai vizsgálatában (35 beteg) ezzel szemben a hízósejtek száma nagyobb volt az áttétet képző melanómák esetén, és korrelált a mikroérdenzítással (71). Hasonló eredményeket írt le Ribatti munkacsoportja 25 esetről készült tanulmányában (72).

A MELANÓMA METASZTÁZISAIT INFILTRÁLÓ IMMUNSEJTEK PROGNOSZTIKAI JELENTŐSÉGE

Kevés tanulmány foglalkozott a melanómaáttéteket infiltráló immunsejtek mennyiségének prognosztikai szerepével. A nagyrészt nyirokcsomó-, bőr- és szubkután metasztázisokon végzett vizsgálatokban az összes TIL (73, 74), illetve a CD3⁺ T-sejtek száma (74) korrelációt mutatott a betegek túlélésével. Egy másik, nagyobb esetszámú vizsgálatban (147 beteg) a CD3⁺ és CD8⁺ T-sejtek, valamint a CD20⁺ B-limfociták emelkedett mennyisége is jó prognózissra utalt, míg egyéb markereket (CD4, CD56, CD163, DC-LAMP) hordozó immunsejtek esetén nem találtak szignifikáns összefüggést (75).

KÖVETKEZTETÉSEK

A szolid daganatok szerves részét képező gazdaszervezeti sejtek a malignus tumorsejtekkel kölcsönhatásban alakítják ki a tumorok mikrokörnyezetét. E sejtek pozitív és negatív hatást is gyakorolhatnak a daganatprogresszióra. A tumorokhoz társult gyulladás, melynek jellemzői a felfhívósejtek felgyülemzése mellett az általuk (is) termelt citokinek, kemokinek jelenléte, valamint aktív szövetátépülés és érújdonképződés, a daganatok növekedésének, inváziójának és áttétképzésének kedvező feltételeket biztosít. Az e folyamatokban fontos szerepet játszó tumorasszociált

makrofágok, hízósejtek és neutrofil granulociták esetében a daganatprogressziót serkentő hatások dominálnak, fokozott infiltrációjuk többnyire kedvezőtlen prognózisa utal. Másrészt viszont a hatékony adaptív immunválasz kialakulása csökkenti a daganatkiújulás, az áttétképződés esélyét, így pozitívan befolyásolja a betegség kimenetelét. Az ebben kulcsszerepet játszó T-limfocita-alcsoportok és antigénprezentáló dendritikus sejtek infiltrációja ennek megfelelően általában kedvező prognózissal jár együtt. Több immunsejttípus esetén a betegség kimenetelére gyakorolt hatás függ a daganat típusától, stádiumától, illetve az infiltrátum tumoron belüli lokalizációjától, befolyásolhatja továbbá az immunsejtek funkcionális heterogenitása és egymással, valamint a daganatos mikrokörnyezet egyéb elemeivel való kölcsönhatása.

Melanóma esetén a legtöbb prognosztikai célú vizsgálatot a limfoid infiltrátum – limfocita-alcsoportokat nem megkülönböztető – mennyiségi meghatározására vonatkozóan végezték, igen ellentmondásos eredménnyel. Hasonlóképpen, egyértelmű következtetés nem vonható le a T-sejtek számának prognosztikai összefüggéseit célzó, többnyire kis esetszámú tanulmányokból. Saját vizsgálatainkban a CD25, illetve CD134 aktivációs markert expresszáló T-limfociták magas peritumorális denzitása kedvező prognózissal járt együtt. A FOXP3⁺ regulátor T-sejtek mennyisége ezzel szemben nem mutatott összefüggést a betegség kimenetelével. Bár a melanómát – a többi daganattípushoz hasonlóan – a limfoid elemek közül a T-sejtek dominanciája jellemzi, az esetek nagy részében jelentős mennyiségű B-limfocitát is megfigyeltünk, melyek fokozott infiltrációja prognosztikai előnyt jelentett. A B-sejtek denzitása korrelált az aktivált T-limfocitákéval, és a két sejttípus mennyiségének együttes elemzésével nyert csoportok túlélési valószínűsége eltérő volt, mely felveti annak a lehetőségét, hogy a tumorok környezetében a B-limfociták a T-sejtek aktiválódását elősegítő antigénprezentáló sejtekként funkcionálhatnak. A leghatékonyabb antigénprezentáló sejtnak tartott dendritikus sejtek, különösen az érett DC-k infiltrációja szintén összefüggést mutatott a betegség kimenetelével. Hasonlóan a B-limfocitákhoz, e sejtek denzitása is korrelációt mutatott az aktivált T-sejtekével, s mennyiségük együttes elemzése az egyidejű magas DC- és aktivált T-sejt-számú eseteknek a többi csoporthoz viszonyított kedvező kimenetelére utalt. Más kutatócsoportok vizsgálatai alapján a neutrofil granulocitáknak az – egyéb tumortípusoknál rossz prognózissal járó – intenzív infiltrációja melanóma esetében is rövidebb túléléssel volt kapcsolatba hozható. A makrofágok mennyiségének prognosztikai szerepe ugyanakkor ellentmondásos, egyéb sejttípusok esetében pedig nem állnak rendelkezésre megbízható, kielégítő esetszámú vizsgálattal alátámasztott adatok.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom a bőrgyógyász-onkológus kollégáknak (dr. Fejős Zsuzsanna, dr. Gilde Katalin, dr. Liszky Gabriella és dr. Somlai Beáta) a beteganyaggal kapcsolatos információk rendelkezésre bocsátásáért, Gaudi Istvánnak a statisztikai elemzésben nyújtott segítségért, Parragné Derecskei Katalinnak és Piurkó Violetának az immunhisztokémiai reakciók kivitelezéséért, valamint dr. Kiss Juditnak és dr. Mohos Anitának az ezek értékelésében nyújtott segítségért. A vizsgálatokat az OTKA 72836, ETT 444/2000 és ETT 308/2003 sz. grantok támogatásával végeztük.

IRODALOM

1. Thor Straten P, Becker JC, Guldberg P, Zeuthen J. In situ T cells in melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 34:386–395, 1999
2. Anichini A, Vegetti C, Mortarini R. The paradox of T cell-mediated antitumor immunity in spite of poor clinical outcome in human melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 53:855–864, 2004
3. Gajewski T. Failure at the effector phase: Immune barriers at the level of the melanoma tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 13:5256–5261, 2007
4. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357:539–545, 2001
5. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 420:860–867, 2002
6. Solinas G, Marchesi F, Garlanda C, et al. Inflammation-mediated promotion of invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 29:243–248, 2010
7. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42:717–727, 2006
8. Allavena P, Sica A, Solinas G, et al. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* 66:1–9, 2008
9. Coffelt SB, Hughes R, Lewis CE. Tumor-associated macrophages: Effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1796:11–18, 2009
10. Ribatti D, Crivellato E. Immune cells and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 13:2822–2833, 2009
11. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 86:1065–1073, 2009
12. Houghton AM. The paradox of tumor-associated neutrophils. Fueling tumor growth with cytotoxic substances. *Cell Cycle* 9:1732–1737, 2010
13. Piccard H, Muschel RJ, Opdenakker G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 82:296–309, 2012
14. Khazaei K, Blatner NR, Khan MW, et al. The significant role of mast cells in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 30:45–60, 2011
15. Ribatti D, Crivellato E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Biochim Biophys Acta* 1822:28, 2012
16. Senovilla L, Vacchelli E, Galon J, et al. Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *OncoImmunology* 1:1323–1343, 2012
17. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313:1960–1964, 2006
18. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol* 29:610–618, 2011

19. Galon J, Pagès F, Marincola FM, et al. The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J Transl Med* 10:1, 2012
20. Galon J, Pagès F, Marincola FM, et al. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med* 10:205, 2012
21. Ladányi A. Emberi daganatokot infiltráló immunsejtek funkcionális és prognosztikai jelentősége. *Magy Onkol* 48:49–56, 2004
22. Cipponi A, Wieers G, van Baren N, Coulie PG. Tumor-infiltrating lymphocytes: apparently good for melanoma patients. But why? *Cancer Immunol Immunother* 60:1153–1160, 2011
23. Sondergaard K, Schou G. Survival with primary cutaneous malignant melanoma, evaluated from 2012 cases. A multivariate regression analysis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 406:179–195, 1985
24. Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 30:2678–2683, 2012
25. Larsen TE, Grude TH. A retrospective histological study of 669 cases of primary cutaneous malignant melanoma in clinical stage I. 3. The relation between the tumour-associated lymphocyte infiltration and age and sex, tumour cell type, pigmentation, cellular atypia, mitotic count, depth of invasion, ulceration, tumour type and prognosis. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 86:523–530, 1978
26. Thörn M, Pontén F, Bergström R, et al. Clinical and histopathologic predictors of survival in patients with malignant melanoma: a population-based study in Sweden. *J Natl Cancer Inst* 86:761–769, 1994
27. Burton AL, Roach BA, Mays MP, et al. Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in melanoma. *Am Surg* 77:188–192, 2011
28. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D IV, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 81:1893–1904, 1989
29. Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, et al. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77:1303–1310, 1996
30. Barnhill RL, Fine JA, Roush GC, Berwick M. Predicting five-year outcome for patients with cutaneous melanoma in a population-based study. *Cancer* 78:427–432, 1996
31. Taylor RC, Patel A, Panageas KS, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 25:869–875, 2007
32. Mandalà M, Imberti GL, Piazzalunga D, et al. Clinical and histopathological risk factors to predict sentinel lymph node positivity, disease-free and overall survival in clinical stages I–II AJCC skin melanoma: Outcome analysis from a single-institution prospectively collected database. *Eur J Cancer* 45:2537–2545, 2009
33. Piras F, Colombari BA, Minerba L, et al. The predictive value of CD8, CD4, CD68 and human leukocyte antigen-D-related cells in the prognosis of cutaneous malignant melanoma with vertical growth phase. *Cancer* 104:1246–1254, 2005
34. van Houdt IS, Sluijter BJR, Moesbergen LM, et al. Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating T-lymphocytes and preserved MHC class I antigen expression. *Int J Cancer* 123:609–615, 2008
35. Hillen F, Baeten CIM, van de Winkel A, et al. Leukocyte infiltration and tumor cell plasticity are parameters of aggressiveness in primary cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 57:97–106, 2008
36. Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, et al. Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer* 118:2476–2485, 2012
37. Kiss J, Timár J, Somlai B, et al. Association of microvessel density with infiltrating cells in human cutaneous malignant melanoma. *Pathol Oncol Res* 13:21–31, 2007
38. Ladányi A, Somlai B, Gilde K, et al. T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 10:521–530, 2004
39. Knutson KL, Disis ML, Salazar LG. CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis. *Cancer Immunol Immunother* 56:271–285, 2007
40. deLeeuw RJ, Kost SE, Kakal JA, Nelson BH. The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: A critical review of the literature. *Clin Cancer Res* 18:3022–3029, 2012
41. Miracco C, Mourmouras V, Biagioli M, et al. Utility of tumour-infiltrating CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cell evaluation in predicting local recurrence in vertical growth phase cutaneous melanoma. *Oncol Rep* 18:1115–1122, 2007
42. Ladányi A, Mohos A, Somlai B, et al. FOXP3⁺ cell density in primary tumor has no prognostic impact in patients with cutaneous malignant melanoma. *Pathol Oncol Res* 16:303–309, 2010
43. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2: 850–861, 2002
44. Degli-Esposti MA, Smyth MJ. Close encounters of different kinds: Dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol* 5:112–124, 2005
45. Carrega P, Morandi B, Costa R, et al. Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56^{bright}CD16⁺ cells and display an impaired capacity to kill tumor cells. *Cancer* 112:863–875, 2008
46. Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, et al. Profound alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res* 71:5412–5422, 2011
47. Fregni G, Perier A, Avril MF, Caignard A. NK cells sense tumors, course of disease and treatments. Consequences for NK-based therapies. *Oncol Immunology* 1:38–47, 2012
48. Balsamo M, Scordamaglia F, Pietra G, et al. Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:20847–20852, 2009
49. Pietra G, Manzini C, Rivara S, et al. Melanoma cells inhibit natural killer cell function by modulating the expression of activating receptors and cytolytic activity. *Cancer Res* 72:1407–1415, 2012
50. McKay K, Moore PC, Smoller BR, Hiatt KM. Association between natural killer cells and regression in melanocytic lesions. *Hum Pathol* 42:1960–1964, 2011
51. Balsamo M, Vermi W, Parodi M, et al. Melanoma cells become resistant to NK-cell-mediated killing when exposed to NK-cell numbers compatible with NK-cell infiltration in the tumor. *Eur J Immunol* 42:1833–1842, 2012
52. de Visser, Korets LV, Coussens LM. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* 7:411–423, 2005
53. Qin Z, Richter G, Schüler T, et al. B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat Med* 4:627–630, 1998
54. DiLillo DJ, Yanaba K, Tedder TF. B cells are required for optimal CD4⁺ and CD8⁺ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice. *J Immunol* 184:4006–4016, 2010
55. Nelson BH. CD20⁺ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 185:4977–4982, 2010
56. Hersey P, Murray E, Grace J, McCarthy WH. Current research on immunopathology of melanoma: analysis of lymphocyte populations in relation to antigen expression and histological features of melanoma. *Pathology* 17:385–391, 1985
57. Ralfkaier E, Hou-Jensen K, Gatter KC, et al. Immunohistological analysis of the lymphoid infiltrate in cutaneous malignant melanomas. *Virchow Arch A* 410:355–361, 1987
58. Hussein MR, Elsen DAH, Fadel SA, Omar AEM. Immunohistological characterization of tumour infiltrating lymphocytes in melanocytic skin lesions. *J Clin Pathol* 59:316–324, 2006

59. Ladányi A, Kiss J, Mohos A, et al. Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 60:1729–1738, 2011
60. Shortman K, Liu Y-J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 21:151–161, 2002
61. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 9:10–16, 1997
62. Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 73:309–316, 1997
63. Ladányi A, Kiss J, Somlai B, et al. Density of DC-LAMP⁺ mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer Immunol Immunother* 56:1459–1469, 2007
64. Salio M, Cella M, Vermi W, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IFN- γ -secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *Eur J Immunol* 33:1052–1062, 2003
65. Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, et al. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 63:6478–6487, 2003
66. Sica A, Larghi P, Mancino A, et al. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 18:349–355, 2008
67. Dirkx AEM, oude Egbrink MGA, Wagstaff J, Griffioen AW. Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *J Leukoc Biol* 80:1183–1196, 2006
68. Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, et al. Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. *J Clin Oncol* 27:3330–3337, 2009
69. Storr SJ, Saufan S, Mitra A, et al. Objective assessment of blood and lymphatic vessel invasion and association with macrophage infiltration in cutaneous melanoma. *Mod Pathol* 25:493–504, 2012
70. Schadendorf D, Kohlmus C, Gawlik C, et al. Mast cells in melanocytic tumours. *Arch Dermatol Res* 287:452–456, 1995
71. Tóth T, Tóth-Jakatics R, Jimi S, et al. Cutaneous malignant melanoma: Correlation between neovascularization and peritumor accumulation of mast cells overexpressing vascular endothelial growth factor. *Hum Pathol* 31:955–960, 2000
72. Ribatti D, Ennas MG, Vacca A, et al. Tumor vascularity and tryptase-positive mast cells correlate with a poor prognosis in melanoma. *Eur J Clin Invest* 33:420–425, 2003
73. Mihm MC Jr, Clemente CG, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: A histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest* 74:43–47, 1996
74. Bogunovic D, O'Neill DW, Belitskaya-Levy I, et al. Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance clinical staging in predicting patient survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:20429–20434, 2009
75. Erdag G, Schaefer JT, Smolkin ME, et al. Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor-infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma. *Cancer Res* 72:1070–1080, 2012