

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studium biomedicíny 1. LF UK

Studijní obor: Experimentální chirurgie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Martin Šnajdauf

Imunologické rysy karcinomu jícnu a jejich vliv na prognózu a terapii

Immunological features of esophageal carcinoma in prognosis and therapy

Disertační práce

Školitel:

prof. MUDr. Robert Lischke, Ph.D.

Konzultant:

MUDr. Zuzana Střížová, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Nesouhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 28. 2. 2023

MUDr. Martin Šnajdauf

Podpis

ŠNAJDAUF, Martin. Imunologické rysy karcinomu jícnu a jejich vliv na prognózu a terapii [Immunological features of esophageal carcinoma in prognosis and therapy], Praha, 2023. Počet stran 95, počet příloh 0. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, III. chirurgická klinika 1. LF UK. Školitel prof. MUDr. Robert Lischke, Ph.D.

Abstrakt

Karcinom jícnu patří mezi malignity gastrointestinálního traktu s nejhorší prognózou. Současné možnosti léčby, zahrnující chirurgickou resekci, chemoterapii, radioterapii nebo kombinaci těchto způsobů, mají nízkou účinnost a pětileté přežívání se u pacientů s rakovinou jícnu pohybuje pouze okolo 10 až 15 %. Imunoterapie se jako samostatná terapeutická modalita dostala v poslední dekádě do popředí léčby řady solidních tumorů. Úspěch imunoterapeutických přístupů však závisí nejen na infiltraci nádorového mikroprostředí imunitními buňkami, ale též na fenotypu těchto infiltrujících buněk.

Cílem tohoto projektu bylo zhodnotit pomocí průtokové cytometrie imunologické rysy tumor-infiltrujících lymfocytů získaných z různých tkáňových kompartmentů (nádor, peritumorózní tkáň, přilehlá zdravá tkáň a lymfatická uzlina) pacientů během chirurgické resekce a porovnat je s klinickými a histopatologickými daty pacientů.

Bylo zjištěno, že distribuce NK (natural killer) buněk, CD8 a CD4 pozitivních T buněk se liší v závislosti na analyzovaném tkáňovém kompartmentu. Zatímco v lymfatických uzlinách bylo nejvyšší zastoupení CD4 T buněk, u NK buněk tomu bylo právě naopak a jejich procentuální zastoupení v lymfatických uzlinách bylo nejnižší. Výskyt receptorů smrti FasR a DR3 (death receptor 3) byl nejnižší na CD4 T buňkách v lymfatických uzlinách. Dále bylo zjištěno, že u pacientů kuřáků byly nacházeny nejen významně nižší počty peritumorózních T buněk a NK buněk, ale současně všechny tyto buňky vykazovaly velmi vysokou expresi receptorů smrti. Tento výsledek ukazuje, že aktivní kouření má kritický dopad na nádorové mikroprostředí a okolní imunitní buňky a může významně ovlivnit prognózu pacientů s karcinomem jícnu a jejich schopnost odpovědi na imunoterapii. V další studii výsledky ukázaly, že na imunitních CD8 T a NK buňkách je významně vyšší exprese molekuly CD47 než na samotných nádorových buňkách, a tedy karcinom jícnu není vhodný k léčbě anti-CD47 monoklonálními protilátkami, neboť tato léčba bude preferenčně cílit na buňky imunitní a způsobí jejich prioritní likvidaci.

Klíčová slova: karcinom jícnu, imunoterapie, tumor infiltrující lymfocyty (TIL), receptory smrti.

Abstract

Esophageal cancer belongs to the gastrointestinal malignancies with the worst prognosis. Current treatment options, including surgical resection, chemotherapy, radiotherapy, or a combination of these methods, have low efficacy and the five-year survival rate for patients with esophageal cancer is approximately 10 to 15 %. In the last decade, immunotherapy has become the leading treatment modality for metastatic tumors. However, the success of immunotherapeutic approaches does not only depend on the infiltration of the tumor microenvironment with immune cells but also on the phenotype of these infiltrating cells.

The aim of this project was to evaluate the immunological features of tumor-infiltrating lymphocytes obtained from different tissue compartments (tumor, peritumoral tissue, adjacent healthy tissue, and lymph node) of patients during surgical resection and to compare them with clinical and histopathological data of patients.

We observed that the distribution of NK (natural killer) cells, CD8 and CD4 positive T cells was different in each tissue compartment. While the lymph nodes had the highest percentage of T cells, the opposite was seen in NK cells. The proportion of NK cells was the lowest in the lymph nodes. The expression of death receptors FasR and DR3 (death receptor 3) was the lowest on CD4 T cells infiltrating the lymph nodes. Furthermore, we demonstrated that significantly lower proportions of peritumoral T cells and NK cells were shown in patients that were actively smoking. Furthermore, these cells displayed also a very high expression of death receptors. Our results thus demonstrated that active smoking has a critical impact on the tumor microenvironment and the adjacent tissue infiltrating immune cells and can significantly affect the prognosis of patients with esophageal cancer. In the next study, a significantly higher levels of CD47 molecule were expressed on the CD8 T and NK cells rather than on the tumor cells. These data suggest that esophageal cancer may not be suitable for the treatment with anti-CD47 monoclonal antibodies, as they will preferentially target immune cells.

Keywords: esophageal carcinoma, immunotherapy, tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), death receptors.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract.....	5
1. Úvod.....	7
1.1 Epidemiologie karcinomu jícnu.....	7
1.1.1 Adenokarcinom	7
1.1.2 Dlaždicobuněčný karcinom.....	9
1.2 Stručná anatomie, histologie a fyziologie jícnu.....	10
1.3 Klinická manifestace karcinomu jícnu	11
1.4 Diagnostika a staging karcinomu jícnu	12
1.5 Léčba karcinomu jícnu.....	14
1.5.1 Časný karcinom.....	14
1.5.2 Lokálně pokročilý karcinom jícnu	19
1.5.3 Metastatický karcinom jícnu (cM+)	28
1.5.4 Imunoterapie a cílená terapie v neoadjuvantním a adjuvantním režimu	31
1.5.5 Chirurgická léčba	34
2. VLASTNÍ PRÁCE	41
2.1 Cíle práce.....	41
2.2 Cíle a přístupy postupně.....	41
2.2.1 Práce s názvem „The paratumoral immune cell signature reveals the potential for the implementation of immunotherapy in esophageal carcinoma patients.“	41
2.2.2 Práce s názvem „The TRAIL in the Treatment of Human Cancer: An Update on Clinical Trials.“	42
2.2.3 Práce s názvem „Tumoral and paratumoral NK cells and CD8 ⁺ T cells of esophageal carcinoma patients express high levels of CD47“	42
2.3 Výsledky a diskuze	42
2.3.1 Práce s názvem „The paratumoral immune cell signature reveals the potential for the implementation of immunotherapy in esophageal carcinoma patients.“	43
2.3.2 Práce s názvem „The TRAIL in the Treatment of Human Cancer: An Update on Clinical Trials.“	59
2.3.3 Práce s názvem „Tumoral and paratumoral NK cells and CD8 ⁺ T cells of esophageal carcinoma patients express high levels of CD47“	70
2.4 Závěr	80
Použitá literatura	81

1. Úvod

1.1 Epidemiologie karcinomu jícnu

Karcinom jícnu je svou incidencí sedmou nejčastější malignitou na světě (604 tisíc nových případů) a šestou nejčastější příčinou úmrtí na maligní onemocnění (544 tisíc úmrtí). Jeho incidence má vzrůstající tendenci. V roce 2020 tak každé osmnácté úmrtí na malignitu bylo způsobeno karcinomem jícnu. Incidence je vyšší u mužů, kteří reprezentují zhruba 70 % nových případů a mají tak 2-3x vyšší incidenci i mortalitu. Nejvyšší incidence karcinomu jícnu je ve východní Asii, jižní a východní Africe, severní Evropě a v jižních státech Střední Asie (Sung, Hyuna et al.). V takzvaném pásu karcinomu jícnu (Esophageal Cancer Belt) zahrnujícím Turecko, Kazachstán, severní a centrální Čínu se vyskytuje více než 85 % všech karcinomů jícnu, a to především dlaždicobuněčného (Zhang Y., 2013).

V Evropě je incidence karcinomu jícnu 5/100 000 u mužů a 2,2/100 000 u žen, čímž zaujímá dvacáté místo mezi malignitami. Nejvyšší výskyt je v Nizozemí, Velké Británii a Dánsku (Ferlay, J et al. 2018). V České republice je karcinom jícnu čtrnáctou nejčastější malignitou u mužů a třiadvacátou u žen. V roce 2018 bylo v ČR nově diagnostikováno 545 případů karcinomu jícnu. Jeho incidence ve stejném roce byla 6,8/100 000 a mortalita 4,9/100 000.

Nejčastějšími typy karcinomu jícnu jsou adenokarcinom (AC) a dlaždicobuněčný karcinom (SCC). Oba tyto typy představují asi 98 % všech karcinomů jícnu. Zbýlá 2 % představují různé typy sarkomů, malobuněčné karcinomy, melanomy a karcinoidy.

Po většinu 20. století byl dominantním typem SCC. Během posledních 30 let ale dramaticky roste ve vyspělých zemích výskyt AC. Studie z roku 2001 prokázala roční nárůst jeho incidence na 30 % v jižní Evropě, 23,5 % v Austrálii a 20,6 % v USA (Bollschweiler, E et al. 2001). Podle databáze SEER došlo v USA mezi lety 1979 a 2009 až k 400% vzrůstu incidence AC (Dubecz, A et al. 2003).

1.1.1 Adenokarcinom

Většina adenokarcinomů má tendenci vznikat v distálním jícnu z metaplastického epitelu s cylindrickou výstelkou, běžně známém jako Barrettův jícen (BJ), který nahrazuje dlaždicový epitel během hojící se refluxní ezofagitidy a může progredovat do dysplazie (Zhang Y., 2013).

Jeho hlavní příčinou je gastroezofageální reflux (GERD), který byl prokázán jako silný a nezávislý rizikový faktor pro vznik AC jícnu již v devadesátých letech 20. století (Chow WH et al, 1995, Lagergren, J et al. 1999). Délka trvání refluxu a více vyjádřené refluxní symptomy způsobují závažnější poškození sliznice jícnu a zvyšují riziko vzniku AC. Pacienti s BJ jsou zatíženi 30-60násobně vyšším rizikem vzniku AC (Cossentino M., Wong R., 2003).

Dalším hlavním rizikovým faktorem vzniku AC jícnu je obezita. Analýza dvanácti populačních studií prokázala 2,4násobné riziko pro BMI 30-34,9, 2,8násobné pro BMI 35-39,9 a 4,8násobné pro BMI nad 40 (Hoyo, Cathrine et al. 2012). Obezita je nepřímým faktorem, který zvyšuje riziko GERD mechanicky zvýšením nitrobřišního tlaku, snížením tonu dolního jícnového svěrače (DJS) a zvýšením rizika hiátové kýly (Cook, Michael B et al. 2008, Corley, Douglas A et al. 2007).

Naopak prodělaná infekce *Helicobacter pylori*, vyšší konzumace ovoce a zeleniny a zřejmě i užívání nesteroidních antiflogistik snižují riziko vzniku AC jícnu. Zvyšující se prevalence obezity a GERD se snižující se prevalencí infekce *H. pylori* jsou pravděpodobně hlavními příčinami vzrůstající incidence AC jícnu (Lagergren J, Lagergren P 2013).

Kouření je uváděno jako výrazný rizikový faktor vzniku SCC, nicméně bylo prokázáno, že zvyšuje dvakrát i riziko vzniku AC, a naopak ukončení kouření toto riziko snižuje (Cook, Michael B et al. 2010).

Konzumace alkoholu nezvyšuje incidenci AC, naopak mírná konzumace vína snižuje relativní riziko (OR) jeho vzniku na 0,6 (Gammon, M D et al. 1997).

Většina AC se nachází v distálním jícnu v blízkosti gastroezofageální junkce (GEJ) a je spojena s endoskopickým průkazem BJ. Adenokarcinom vznikající z BJ se může projevovat jako vřed, uzlík, změněný slizniční obrazec nebo může být zastižen i ve sliznici bez endoskopicky patrné abnormality (Paraf, F et al. 1995).

Z dostupných dat byla navržena preventivní strategie pro AC jícnu. Primární strategie zahrnuje snížení konzumace červeného a průmyslově zpracovaného masa, vyšší konzumaci ovoce a zeleniny, udržování nižšího BMI a snížení konzumace léků snižujících tonus DJS. V sekundární prevenci se uplatňuje endoskopické sledování bílých mužů nad 50 let věku s příznaky GERD trvajících přes 5 let. Terciární prevencí je pravidelné endoskopické sledování pacientů s BJ a endoskopická léčba dysplastických změn a časných karcinomů (Chung, Chen-Shuan et al. 2015).

1.1.2 Dlaždicobuněčný karcinom

Dlaždicobuněčný karcinom vzniká maligní transformací hyperplastických a dysplastických bazálních buněk sliznice. Tyto změny jsou indukovány zánětem vyvolaným dlouhotrvající expozicí karcinogenů (Chung, Chen-Shuan et al. 2015).

Hlavním rizikovým faktorem vzniku SCC jícnu je kouření a zvýšená konzumace alkoholu. V kombinaci se tyto rizikové jevy potencují. Vliv má i polykání toxinů vznikajících během kouření (Prabhu, Anoop et al. 2014). Karcinogenně na sliznici jícnu působí hlavní metabolit alkoholu acetaldehyd. Ve východní Asii se vyskytuje varianta genu pro aldehyd dehydrogenázu 2 (ALDH2) a acetaldehyd dehydrogenázu (ADH1B). Nositelé těchto variant produkují zvýšené množství acetaldehydu při konzumaci alkoholu a mají 43-73násobně vyšší riziko vzniku SCC (Yokoyama, Tetsuji et al. 2003).

Recentní metaanalýza prokázala pětinasobné riziko vzniku SCC u kuřáků v západních zemích a trojnásobné riziko v Asii a Jižní Americe (Wang, Qiao-Li et al. 2017). Nekouřit nebo přestat s kouřením je zřejmě nejefektivnější primární preventivní opatření proti vzniku SCC (Bosetti, Cristina et al. 2006). Lidé s nižším socioekonomickým statusem, tedy lidé s nižším vzděláním a nižšími příjmy, mají vyšší riziko vzniku SCC. To bylo prokázáno v rozvojových i ekonomicky rozvinutých zemích. V Číně je oblíbená nakládaná zelenina bez použití octa, která se v některých oblastech konzumuje po většinu roku. Její častá konzumace zvyšuje dvakrát riziko vzniku SCC. Pacienti s Fanconiho anémií a achalázií jsou taktéž ve vyšším riziku (Abnet, Christian C et al. 2018).

Dalšími prokázanými rizikovými faktory jsou konzumace horkých nápojů a jídel (Chen, Yawen et al. 2015), červeného a průmyslově zpracovaného masa (Qu, Xudong et al. 2013), žvýkání betelových listů (Chung, Chen-Shuan et al. 2010). Konzumace ovoce a zeleniny působí naopak preventivně (Liu, Jun et al. 2013).

Obdobná preventivní strategie jako pro AC byla navržena pro SCC. V primární prevenci se uplatňuje omezení konzumace alkoholu, kouření tabákových výrobků, žvýkání betelových listů, snížení konzumace masa, průmyslově zpracovaných potravin a příliš horkých nápojů. Pozitivní vliv má konzumace ovoce a zeleniny. Sekundární prevencí je endoskopické sledování populace s výše uvedenými rizikovými návyky a lidí s anamnézou karcinomu hlavy a krku. Terciární prevencí je endoskopická léčba dysplastických změn sliznice a časných karcinomů (Chung, Chen-Shuan et al. 2015).

1.2 Stručná anatomie, histologie a fyziologie jícnu

Jícen je 20-25 cm dlouhá svalová trubice spojující hltan se žaludkem, která zajišťuje transport potravy a sekretů. Probíhá zadním mediastinem. Na obou koncích má jícen svěrače. Horní jícnový svěrač (krikofaryngeální) je v klidu uzavřen a brání vstupu vzduchu při dýchání. Dolní jícnový svěrač (DJS) umožňuje prostup sousta do žaludku a za normálních okolností brání jeho permanentní zvýšený tonus zpětnému toku žaludečních šťáv.

V krčním úseku probíhá jícen více vlevo, naléhá na páteř a ventrálně na pars membranacea trachey a části levého hlavního bronchu. Ve žlábků mezi tracheou a jícnem probíhá zvrtný nerv. Aortální oblouk vytváří v hrudníku na jícnu zleva impresi a kaudálně probíhající sestupná aorta naléhá na jícen zleva. V distální části je jícen v kontaktu s mediastinální částí obou pleur a levou srdeční síní, dále probíhá skrz hiatus esophagealis do dutiny břišní.

Jícen se liší svou strukturou od ostatních částí trávicího traktu. Nejpevnější strukturou je sliznice, která je na povrchu kryta vícevrstevným dlaždicovým epitelem. Mezi sliznicí a svalovou vrstvou je submukóza bohatá na lymfatické cévy. Svalová vrstva lamina muscularis propria je tvořena z vnitřní vrstvy cirkulárních a zevní vrstvy longitudinálních vláken. Svalovina jícnu je tvořena v horní třetině příčně pruhovanými vlákny, ve střední třetině přechází do hladkých vláken, která jsou výhradně zastoupena v distální třetině. Mezi oběma svalovými vrstvami se nachází myenterická nervová pleteň (Auerbachova). Příčně pruhovaná svalovina je inervována vlákny bloudivého nervu, hladká svalovina je inervována parasympatickými vlákny přes myenterickou pleteň. Sympatickou inervaci zajišťují krční a hrudní větve truncussympaticus. Navzdory rozdílné svalové stavbě i inervaci se jícen chová jako ucelená funkční jednotka s výbornou koordinací.

Zevně je jícen krytý adventicií, tenkou nebuněčnou průhlednou blankou. Intraabdominální část jícnu je jako zbytek trávicí trubice krytá serózou. Vzhledem k absenci pevné serózy kolem jícnu je v jícnové chirurgii důležitá sutura sliznice, její nejpevnější vrstvy.

Jícen je zásobován krví z okolních arterií. V horní části z a. thyroideainferior, dále z aa. intercostales, rr. bronchiales a rr. oesophagei z hrudní aorty. V abdominální části je to cestou a. gastricasinistra a a. phrenicainferiorsinistra. Odtok žilní krve probíhá ze submukózních pletení do povrchových plexů a dále do okolních žil (vv. thyroideae, v. hemiazygos, v. azygos a v. coronariaventriculi).

Z onkochirurgického hlediska je důležitá lymfatická drenáž jícnu. Začíná komunikujícími lymfatickými cévami v podslizničním vazivu a po průchodu svalovou vrstvou je lymfa drénována do periesofageálních lymfatických uzlin (LU). V krční části je lymfa drénována především do hlubokých krčních LU, v hrudní části do tracheobronchiálních a zadních mediastinálních LU a z distálního jícnu do perigastrických LU, hlavně v oblasti truncuscoeliacus. LU kolem jícnu vzájemně komunikují lymfatickými cévami, takže karcinom jícnu může bez ohledu na jeho lokalizaci metastazovat do jakýchkoliv periesofageálních LU.

Pro staging onemocnění a volbu chirurgického výkonu se jícen rozděluje na několik oblastí. Umístění nádoru se měří při endoskopii v centimetrech jako vzdálenost středu tumoru od řezáků. Jako krční jícen (15-20 cm od řezáků) se označuje úsek jícnu od HJS po jugulum. Horní hrudní jícen (20-25 cm) od jugula po dolní okraj v. azygos. Střední hrudní jícen (25-30 cm) představuje úsek od dolního okraje v. azygos po dolní okraj dolní plicní žíly. Dolní hrudní jícen (30-40 cm), často označovaný jako distální jícen, je část od dolní plicní žíly po kardii žaludku. Tumory v oblasti kardiie jsou posuzovány podle vzdálenosti jejich epicentra od gastroesofageální junkce (GEJ) dle Siewertovy klasifikace. Tumory s epicentrem 1-5 cm nad GEJ jsou klasifikovány jako Siewert I, tumory 1 cm nad a 2 cm pod GEJ jako Siewert II a tumory 2-5 cm pod GEJ jako Siewert III (Siewert, J R, and H J Stein., 1998).

1.3 Klinická manifestace karcinomu jícnu

Časné nádory nemají specifickou klinickou manifestaci a jsou nejčastěji diagnostikovány náhodou nebo v rámci endoskopického sledování. Nejčastějším klinickým projevem pokročilého karcinomu jícnu je zhoršující se dysfagie. Jejím patologickým podkladem je obturace lumen jícnu narůstajícím tumorem. Nejdříve se manifestuje pro větší tuhá sousta. Postupem času mají pacienti problém polknout i kašovitou stravu a tekutiny. Při úplné obstrukci dochází ke kompletní afagii, kdy pacient není schopen polknout ani vlastní sliny.

Méně často se vyskytuje bolest při polykání (odynofagie). Dalšími příznaky při erozi nádoru a krvácení může být chronická anemizace, při masivnějším krvácení hemateméza nebo meléna. Vzácně se může dojít k erozi aorty a vzniku aortoesofageální píštěle s rizikem fatálního krvácení. Při nádorové invazi zvratného nervu dochází k rozvoji chrapotu. Při prorůstání nádoru do dýchacích cest se může objevit tracheoesofageální či brochoesofageální píštěl projevující se kašlem s rizikem vzniku bronchopneumonie.

Snížení kalorického příjmu vede k redukci váhy a kachektizaci. Pacienti s karcinomem jícnu, kteří předoperačně ztratí více než 10 % váhy, mají snížené pětileté přežívání (van der Schaaf, Maartje K et al. 2014).

1.4 Diagnostika a staging karcinomu jícnu

Stěžejní roli v diagnostice karcinomu jícnu má endoskopické vyšetření. Posoudí přesnou lokalizaci, velikost a lokální pokročilost nádoru. Slouží také k provedení biopsie na histologické vyšetření. Negativní histologický výsledek při klinickém podezření na karcinom by měl vést k opakování biopsie. V případě nálezu časně léze se posoudí možnost endoskopické resekce léze. Časně nádory lze snadno přehlédnout, proto je doporučováno použití chromodiagnostiky kyselinou octovou a Lugolovým roztokem.

Po zjištění diagnózy je nutné určit klinické stadium onemocnění (c staging). To je zásadní pro volbu metody léčby i pro prognózu pacienta. Podle americké SEER databáze je celkové pětileté přežití u pacientů s karcinomem jícnu 19 %. Pacientů s lokalizovaným onemocněním bez postižení lymfatických uzlin přežívá 5 let skoro 45 %, zatímco pacientů se vzdálenými metastázami přežívá 5 let pouze 5 % (www.seer.cancer.gov). Pětileté přežití pacientů s nádory T1a je kolem 80 % (Amin, Rajan N et al. 2016).

Pro určení stagingu onemocnění jsou zásadní zobrazovací metody. Používá se endosonografie (EUS), CT krku, hrudníku a břicha s intravenózním podáním kontrastní látky nebo ¹⁸F-fluorodeoxyglukóza pozitronová emisní tomografie (FDG-PET) prováděná většinou simultánně s CT vyšetřením (PET/CT). EUS nejlépe určí T staging a případné postižení LU hrudníku, méně senzitivní je u LU nacházejících se pod bránicí. Metaanalýza 44 studií prokázala senzitivitu EUS 79 % pro T staging a 71 % pro N staging (Luo, Lin-Na et al. 2016). Limitem endosonografického vyšetření je neprostupná stenóza při pokročilém tumoru. CT vyšetření je nepřesné v určování T stagingu, nicméně je velmi přínosné k posouzení vztahu nádoru k okolním strukturám. Identifikuje přímé prorůstání nebo jeho zvýšené riziko při vymizení tukové vrstvy mezi nádorem a okolním orgánem. Při podezření na vzdálenou metastázu je vhodné doplnit FDG-PET, které je pro detekci metastáz nejpřesnější a má i vysokou specifitu v hodnocení LU. Doplnění PET/CT po vyšetření pomocí CT vedlo k významné změně klinického stadia i léčebného postupu u 24 % pacientů (You, John J et al.

2013). Karcinomy jícnu (AC i SCC) tvoří vzdálené metastázy nejčastěji v játrech, nespádových LU, plicích, kostech a mozku (Wu, San-Gang et al. 2017).

FDG-PET/CT je doporučováno ke klinickému stagingu u karcinomu jícnu, pokud je dostupné a neprodlouží příliš vyšetřovací proces. Jeho výhodou je i možnost měření metabolické odpovědi v průběhu nebo po neoadjuvantní léčbě. Je také metodou volby v případě recidivy onemocnění, kdy má vysokou senzitivitu 89-100 % a nižší specifitu 55-94 % (Goense, Lucas et al. 2015).

U lokálně pokročilých nádorů naléhajících na tracheu, její bifurkaci nebo levý hlavní bronchus je doporučována bronchoskopie k vyloučení jejich infiltrace.

Kromě stagingových vyšetření musí pacienti před plánovanou léčbou podstoupit funkční vyšetření k posouzení kardiovaskulární a plicní kapacity (spirometrie, echokardiografie, spiroergometrie) a nutriční vyšetření. Navíc by měl být pacient vyšetřen zkušeným intenzivistou či internistou pro zhodnocení celkového stavu a zvážení únosnosti operace.

V současné době je k stagingu karcinomu jícnu používána 8. verze klasifikačního systému Americké multidisciplinární komise pro neoplázie (American Joint Committee on Cancer, AJCC) a Unie pro mezinárodní boj proti rakovině (The Union for International Cancer Control, UICC). Tento systém je koncipován podle tradiční anatomické TNM klasifikace, kdy T představuje primární tumor, N regionální lymfatické uzliny a M vzdálené metastázy. Rozlišuje se na cTNM (klinický staging na podkladě zobrazovacích vyšetření), pTNM (patologický staging po prosté esofagektomii) a ypTNM (staging po neoadjuvantní terapii a esofagektomii). Neanatomická klasifikace zahrnuje grading tumoru (G), jehož určení je důležité pro patologický staging časných karcinomů a rozhodování o tom, zdali byla endoskopické resekce kurativní. Nově byl pT1 rozdělen na pT1a (mukóza) a pT1b (submukóza). Grade 4 (nediferencovaný nádor) byl zrušen. Pokud rebiopsie nebo imunohistochemické metody nejsou schopny určit histologický typ nádoru, je považován za G3 SCC. Další inovativní neanatomickou klasifikací je lokalizace tumoru (L), která nehraje roli pro adenokarcinomy, ale společně s gradingem slouží k subklasifikaci dlaždicobuněčného karcinomu pT3N0M0. Nově se prorůstání tumoru na peritoneum klasifikuje jako T4a. Byla redefinována mapa lymfatických uzlin (N staging), aby lépe refletovala lymfatickou drenáž jícnu od supraklavikulárních uzlin až po uzliny v oblasti truncus coeliacus.

Další změnou je, že tumory s epicentrem do 2 cm distálně od GEJ (Siewert I a II) jsou klasifikovány a léčeny jako tumory jícnu. Pokud je epicentrum distálnější než 2 cm od GEJ

(Siewert III), je tumor klasifikován a léčen jako nádor žaludku, i když infiltruje jícen (D'Journo, XavierBenoit 2018).

1.5 Léčba karcinomu jícnu

Všichni pacienti s dokončeným stagingem karcinomu jícnu a všemi funkčními vyšetřeními by měli být posouzeni multioborovým týmem. Jeho součástí by měli být zkušený chirurg, klinický onkolog, radiační onkolog, radiolog, patolog a internista či intenzivista. Společně by měli navrhnout nejlepší léčebný postup zohledňující staging, věk, nutriční a celkový stav pacienta a jeho případná přání. V posledních letech se zkoumá efekt předoperační přípravy (fyzické cvičení a nutriční příprava) na zlepšení celkového stavu pacienta a jeho schopnosti podstoupit předoperační onkologickou léčbu v plném rozsahu a snížení pooperačních komplikací (Le Roy, Bertrand et al. 2016). Při návrhu léčebného plánu je třeba zohlednit klinický staging a histologický typ nádoru, věk a celkový stav pacienta.

1.5.1 Časný karcinom

Časný karcinom jícnu (cT1) zasahuje svým růstem pouze do mukózy (T1a) nebo submukózy (T1b) a nemá známky zasažení lymfatických uzlin (cN0). V minulosti byli všichni pacienti s histologicky verifikovaným časným karcinomem jícnu odesíláni k operačnímu řešení. V současné době je možné tyto časně nádory resekovat endoskopicky a následně provést přesný histopatologický staging. Na podkladě jeho výsledku se určí, zdali byl výkon radikální a kurativní a zdali je nutná další chirurgická léčba, nebo bude pacient pouze sledován. Výkon je obecně kurativní, pokud byl nádor odstraněn celý (R0 resekce) a pokud je riziko lymfatického šíření u daného klinického stadia velmi malé. Endoskopická resekce je tedy diagnostická i stagingová metoda, která má v určitých případech i kurativní charakter.

V současné době se používají dvě endoskopické resekční metody. Endoskopická mukózní resekce (EMR) a endoskopická submukózní disekce (ESD). EMR s využitím cylindru nebo ligátoru je technicky jednodušší. Tato metoda je vhodná k odstranění lézí velikosti do 15 mm. Větší léze nelze touto metodou většinou odstranit v jednom kuse (en-bloc), a pak je nutné lézi odstranit po částech (piece-meal metoda). Ačkoliv takto nelze provést přesný patologický staging, je toto odstranění po částech akceptovanou technikou léčby časných adenokarcinomů jícnu, pokud je endoskopista schopný garantovat radikální odstranění celé

léze. ESD je náročnější na naprovedení, a tedy i erudici endoskopisty. Touto metodou je možné odstranit en-bloc i větší léze. Metoda je preferována k léčbě časných dlaždicobuněčných karcinomů. Odstraněnou tkáň by měl hodnotit zkušený patolog. Kromě radikality resekce, histologického subtypu a diferenciacie nádoru (grading – G) se určuje především hloubka invaze, kdy mukóza a submukóza jsou rozděleny každá na tři podvrstvy dle hloubky prorůstání (m1-3, sm1-3). Sliznice (mukóza) se histologicky dělí na tři vrstvy: epitel (m1), lamina propria mucosae (m2) a lamina muscularismucosae (m3). Z dalších znaků se určuje přítomnost angioinvaze (A), lymfangioinvaze (L) a disociace nádorových buněk (tumor cell dissociation – TCD).

Na podkladě takto podrobného histopatologického stagingu je možné následně rozhodnout o kurativnosti endoskopické resekce. Po rozsáhlých endoskopických resekcích s odstraněním více než 75 % obvodu sliznice hrozí vznik stenózy jícnu. V její prevenci se uplatňuje podávání glukokortikoidů a v léčbě se používá endoskopická balonová dilatace.

Metodou ESD lze úspěšně odstranit 90 % časných karcinomů. U 5 % pacientů se objeví stenóza jícnu, tu lze ale úspěšně řešit endoskopickou dilatací (Sun, Fenghao et al. 2014). ESD v porovnání s EMR je mnohem úspěšnější metodou pro dosažení kompletní en-bloc resekce (92,7 % vs. 52,7 %) a má také menší míru lokální recidivy (0,3 % vs. 11,5 %) (Guo, Hui-Min et al. 2014). Podle rozsáhlé metaanalýzy porovnávající tyto dvě endoskopické metody je EMR vhodná pro léze do 10 mm, pro léze mezi 11-20 mm je možné použít obě metody, pro léze nad 20 mm je doporučováno použít pouze ESD metodu. Vyšší míra lokálních recidiv byla subanalýzou prokázána pouze u lézí větších než 20 mm. Riziko krvácení a vzniku stenóz bylo u obou metod srovnatelné, ESD trvá déle a má vyšší riziko perforace jícnu (Han, Chunyao, et al. 2021).

1.5.1.1 Časný adenokarcinom jícnu

Endoskopická resekce časného adenokarcinomu jícnu je považována za kurativní, pokud nádor zasahuje pouze do mukózy (T1a) nebo pokud nezasahuje hlouběji než 500 µm do submukózy (T1b-sm1), pokud se jedná o radikální resekci R0 a pokud nejsou přítomny další rizikové faktory. Rizikovými faktory jsou přítomnost angioinvaze nebo lymfangioinvaze, pokročilý grading G3-4 nebo pokročilá disociace nádorových buněk. Pokud nádor zasahuje hlouběji do submukózy nebo jsou přítomny výše uvedené rizikové faktory, je riziko

lymfadenopatie vyšší než riziko mortality po resekci jícnu a pacient by měl podstoupit resekci jícnu, případně „adjuvantní“ onkologickou léčbu. Šíření nádoru do submukózy, která obsahuje četné lymfatické cévy, významně zvyšuje riziko průniku nádorových buněk do lymfatických uzlin v porovnání s nádory zasahujícími pouze sliznici (Gamboa, Anthony M et al. 2016).

Riziko lymfadenopatie u karcinomů zasahujících pouze sliznici (m1-3) je do 1 %, u povrchně zasahujících submukózu (sm1) 1-8 %, u nádorů zasahujících hluboko do submukózy (sm2-3) je riziko lymfadenopatie 16-70 % (Maes, Sielte et al. 2018). Mortalita po esofagektomii je ve vysokoobjemových centrech kolem 3 % (Markar SR, Karthikesalingam A et al. 2012).

Adenokarcinom jícnu vyrůstá nejčastěji z terénu Barrettovy metaplázie jícnu, kterou je potřeba i po kurativním odstranění časného karcinomu eradikovat. Riziko metachronního karcinomu po endoskopické resekci časného karcinomu je 30 % během následujících tří let (Ell, Christian et al. 2007). Eradikace ponechaného úseku Barrettova jícnu snižuje riziko recidivy adenokarcinomu a provádí se buďto ablačními metodami, nebo další endoskopickou resekcí, a to ideálně s odstupem 6-12 týdnů, aby se původní resekční plocha zahojila (Okoro, Ngozi I et al. 2012). Nejčastější používanou metodou je endoskopická resekce následovaná radiofrekvenční ablací (RFA). Na souboru 774 pacientů bylo dosaženo kompletní eradikace u 93 % pacientů, stenóza se objevila u 10,2 % a krvácení u 1,1 %. Metoda opakovaných endoskopických resekcí dosahuje obdobnou míru eradikace 95 %, ale riziko stenózy a krvácení je mnohonásobně vyšší (33,5 % resp. 7,5 %) (Desai, Madhav et al. 2017).

1.5.1.2 Časný dlaždicobuněčný karcinom jícnu

Dlaždicobuněčný karcinom je v porovnání s adenokarcinomem agresivnější a časněji metastazuje do lymfatických uzlin. To se odráží i ve strategii jeho endoskopické léčby. Metodou volby je u těchto karcinomů ESD, která umožňuje en-blok resekci. Za kurativní jsou všeobecně považovány R0 resekce slizničních karcinomů zasahujících do prvních dvou vrstev mukózy (m1-2), jsou-li dobře diferencované a nejsou-li přítomny další rizikové faktory (angioinvaze, lymfangioinvaze, vyšší disociace nádorových buněk). Pacienti s nádory zasahujícími hlouběji do sliznice či do submukózy jsou dle většiny doporučených postupů indikováni k další léčbě (ezofagektomie či onkologická léčba). Nicméně u pacientů s nádorem zasahujícím do m3-sm1 (pokud nádor nezasahuje hlouběji než 200 µm do submukózy) bez

dalších rizikových faktorů může být výkon akceptován jako kurativní vzhledem k nízkému riziku lymfadenopatie (Kuwano, Hiroyuki et al. 2015).

1.5.1.3 Adjuvantní léčba po endoskopické resekci časného karcinomu jícnu

Pacienti s časným karcinomem jícnu po endoskopické resekci, která nebyla kurativní (R1 resekce, přítomnost rizikových faktorů) by měli podstoupit další léčbu. Metodou volby je chirurgická ezofagektomie. V případě neúnosnosti podstoupit chirurgický výkon je alternativou podání adjuvantní onkologické léčby. Prospektivní studie sledovala tříleté přežívání pacientů po endoskopické resekci pro časný SCC jícnu, kteří byli rozděleni do tří skupin. Pacienti s pT1a tumorem bez lymfovaskulární invaze (LVI) byli pouze sledováni (skupina A), pacientům s pT1a s LVI a pT1b(sm1-2) byla podána adjuvantní chemoradioterapie (CHRT) 41,4 Gy (skupina B) a pacientům s pozitivním resekcčním okrajem (R1 resekce) byla podána definitivní CHRT 50,4 Gy. Chemoterapie obsahovala 5-fluoruracil a cisplatinu. Celkové tříleté přežívání bylo 90,7 % ve skupině B a 92,6 % ve skupinách A i C. Tato studie prokázala úspěšnost kombinované endoskopické a adjuvantní léčby pro pacienty se SCC pT1b(sm1-2)N0 srovnatelnou s chirurgickou resekci (Minashi, Keiko et al. 2019).

Kombinace endoskopické resekce a adjuvantní CHRT u časných SCC dosahuje lepších kurativních výsledků a má lepší dlouhodobé přežívání než podání definitivní CHRT. Tříleté přežívání u pacientů s časným SCC (pT1b nebo pT1a s LVI) léčených ESD následovanou adjuvantní CHRT je vyšší než u pacientů léčených definitivní CHRT (90 % vs. 63,2 %). Navíc došlo ve skupině s definitivní CHRT k lokální recidivě v 19 % (vs. 0 % u ESD-CHRT) (Kawaguchi, Gen et al. 2015). Jiná studie také prokázala vyšší pětileté přežívání bez progresu po kombinaci ESD-CHRT než po definitivní CHRT (85,1 % vs. 59,2 %) (Yoshimizu, Shoichi et al. 2018). Podání adjuvantní CHRT po endoskopické resekci časného SCC jícnu s rizikovými faktory je nicméně vhodné jako alternativa u pacientů, kteří nejsou schopni nebo ochotni podstoupit chirurgickou ezofagektomii. Ostatní pacienti by měli podstoupit operaci pro dosažení lepších dlouhodobých výsledků a delšího přežívání. Retrospektivní analýza porovnávala skupiny pacientů po ESD pro SCC pT1b, kteří podstoupili adjuvantní CHRT nebo operaci. Tříleté celkové přežívání (OS) a přežívání bez progresu (DFS) byly v obou případech 100 % u skupiny operovaných, zatímco u skupiny s CHRT 90,4 %, respektive 87,4 %. Pětileté OS a DFS klesly u operovaných na shodných 89,5 % a u skupiny s CHRT na 80,3 %, respektive

70,4 %. OS a DFS byly lepší u operovaných pacientů, i když výsledek nebyl statisticky významný. Univariační analýza prokázala jako rizikové faktory recidivy velikost tumoru nad 40 mm a přítomnost lymfangioinvaze (Tanaka, Tsuyoshi et al. 2019). Recentní přehled studií porovnávajících operaci s adjuvantní CHRT po endoskopické resekci časného SCC jícnu prokázal jako rizikové faktory lokální recidivy hloubku invaze $\geq$ sm2 a lymfovaskulární invazi u skupiny s CHRT, ale ne u skupiny operovaných (Tsou, Yung-Kuan et al. 2020). Přínos podání samotné radioterapie (RT) po endoskopické resekci časného karcinomu jícnu je sporný. Retrospektivní analýza americké databáze SEER (surveillance epidemiology and end results) neprokázala signifikantní přínos RT u T1b i T2 stadií. U stadií T1a vedlo podání RT dokonce ke snížení celkového přežívání v porovnání s pacienty bez RT, což je vysvětlováno převážením jejích vedlejších efektů. Limitem této studie je fakt, že v souboru převažovaly adenokarcinomy, které jsou méně radiosenzitivní (Chen, Baofu et al. 2019). Randomizovaná prospektivní studie prokázala rozdíl v přežívání bez recidivy u adjuvantně podané RT 59,4 Gy dva měsíce po endoskopické resekci časného pT1a SCC v porovnání bez RT (100 % vs. 85,3 %). RT byla cílená pouze na lůžko po nádoru, oblast lymfatických uzlin byla vynechána. Terapie tedy nebyla na případné metastázy v LU, ale na lokální recidivu. Ze studie však není zřejmé, zdali se jednalo o recidivu v oblasti jizvy po R0 resekci, což je dost vzácné, nebo se jednalo o metachronní neoplázii jiné lokality, což je u SCC mnohem více časté (Zhang, Yuhang et al. 2020). Number needed to treat (počet pacientů nutných léčit, aby se vyléčil jeden z nich) byl 12, tedy k prevenci lokální recidivy u jednoho pacienta by bylo nutné, aby 12 pacientů po endoskopické resekci SCC pT1a podstoupilo RT (Pech, Alqahtani 2020).

Pacienti po radikální R0 endoskopické resekci časného karcinomu jícnu, kteří mají histopatologické rizikové faktory postižení LU mikrometastázami, bývají indikováni k operaci se záměrem odstranit tyto ohrožené lymfatické uzliny a zabránit dalšímu šíření nádoru. Ideálním postupem, který by umožnil zachovat jícen, by bylo provedení pouze lymfadenektomie. Vzhledem k lymfatické drenáži jícnu by bylo nutné odstranit mediastinální a supramesokolické intraabdominální skupiny uzlin. To by vyžadovalo dvoudutinový přístup a mohla by být ohrožena vaskularizace jícnu s rizikem jeho ischemie nebo rozvoje stenózy. V roce 2016 byla publikována studie, která prokázala proveditelnost torakolaparoskopické lymfadenektomie bez ezofagektomie na čerstvých lidských kadaverech s dostatečným množstvím odstraněných LU (medián 26). V druhé fázi studie se prováděl identický výkon na osmi žijících prasotech. Jedno zemřelo peroperačně na komorovou fibrilaci. Ostatních sedm

přežilo 28 dní. Následně byla provedena eutanázie, makroskopické zhodnocení a histopatologický rozbor jícnu a žaludeční kardie. U žádného vzorku nebyly pozorovány makroskopické či mikroskopické známky ischemie či stenózy (Künzli, H T et al. 2016). Stejná skupina autorů publikovala o rok později studii provedenou na pacientech s časným AC jícnu T1N0M0. V první fázi provedli torakolaparoskopickou lymfadenektomii následovanou ezofagektomií při stejné operaci. Medián odstraněných LU byl 30, medián ponechaných LU na preparátu jícnu byl 6. Na konci lymfadenektomie autoři popisují výskyt barevných změn na jícnu, nejspíše na podkladě ischemie způsobené devaskularizací. Systematická lymfadenektomie bez ezofagektomie u člověka tak zřejmě představuje riziko ischemizace jícnu na rozdíl od prasečích modelů. V druhé fázi studie instilovali nanokoloid s techneciem submukózně kolem nádoru, provedli scintigrafické vyšetření a peroperační odstranění sentinelových uzlin s navigací gama sondou. Byla prokázána vysoká shoda identifikace sentinelových LU mezi předoperační scintigrafií a zobrazením sondou během operace. Medián sentinelových LU byl 5 (Künzli, H T et al. 2017). V jiné recentní podobně designované studii autoři instilovali kromě technecia ještě indocyaninovou zeleň a peroperační identifikaci prováděli kromě gama kamery ještě fluorescenční metodou. Opět prokázali vysokou shodu předoperační a peroperační identifikace sentinelových LU. Medián odebraných LU byl 5 (Overwater, Anouk et al. 2022).

Pokud se dalšími studiemi prokáže onkologická radikalita a dlouhodobé přežívání použitím nové metody odstranění sentinelových LU se zachováním jícnu u pacientů po radikální endoskopické resekci časného karcinomu s přítomností rizikových faktorů lymfatického šíření, pak by mohla nahradit zajišťovací ezofagektomii nebo adjuvantní CHRT u vybraných pacientů.

1.5.2 Lokálně pokročilý karcinom jícnu

Jako lokálně pokročilý se označuje karcinom cT $\geq$ 2 nebo s lymfadenopatií (N+) nebo s oběma znaky bez vzdálených metastáz (M0). Jedná se o klinická stadia II, III a IVa dle 8. edice AJCC. Chirurgická resekce je základní léčebnou modalitou pro lokálně pokročilý karcinom jícnu. Nicméně dlouhodobé přežívání po primární resekci těchto stadií se pohybuje kolem 20 %. Jedním ze zásadních faktorů ovlivňujících přežívání po resekci je dosažení R0 radicality, tedy bez ponechaného mikroskopického rezidua. U lokálně pokročilých resekabilních karcinomů

jícnu bylo při primární resekci dosaženo R0 resekce pouze u 69 % operovaných (van Hagen, P et al. 2012).

Po primární operaci u více než poloviny pacientů dojde k rozvoji vzdálených metastáz a téměř 40 % pacientů má lokoregionální recidivu (Shapiro, Joel et al. 2015). Bylo provedeno mnoho studií, které porovnávaly operaci samotnou s podáním chemoterapie (CHT) či chemoradioterapie (CHRT), a to buď neoadjuvantně před operací, nebo adjuvantně po operaci. Neoadjuvantní terapie má za cíl zmenšit nádor, snížit jeho staging (downsizing, downstaging), a zvýšit tak šanci na kurativní R0 resekci. Neporušené krevní zásobení tumoru by mělo zajistit dostupnost a efektivitu chemoterapeutik v porovnání s adjuvantním podáním. Japonská studie prokázala lepší pětileté přežívání u předoperačně podané chemoterapie oproti pooperačně podané (55 % vs. 43 %) u pacientů se SCC jícnu (Ando, Nobutoshi et al. 2012).

V minulosti publikované studie porovnávající přínos neoadjuvantní CHT či CHRT oproti operaci samotné u lokálně pokročilých karcinomů byly často prováděné na příliš malém vzorku pacientů a přinášely rozporuplné výsledky. Metaanalýza starších randomizovaných klinických studií (RCT) neprokázala jasný přínos neoadjuvantní CHRT v léčbě lokálně pokročilých karcinomů, nicméně počet pacientů v jednotlivých RCT nebyl dostatečný (Wijnhoven, Bas P L et al. 2009).

Pacienti s lokálně pokročilým karcinomem jícnu únosní k operaci mohou podstoupit neoadjuvantní chemoterapii či neoadjuvantní chemoradioterapii následovanou operačním zákrokem.

Staging karcinomu cT4 značí prorůstání do okolních orgánů a jedná se o lokálně velmi pokročilé nádory. T4a tumory prorůstají do resekabilních orgánů, tedy pleury, perikardu nebo bránice. T4b zasahují neresekabilní orgány, tedy aortu, obratel nebo tracheu. Dostupnost efektivní neoadjuvantní léčby schopné zmenšit tumor i snížit klinické stadium a rozvoj moderních operačních technik umožňují konvertovat neresekabilní stadia na resekabilní. Tato strategie je známá jako konverzní terapie a konverzní chirurgie. Používá se především u kolorektální chirurgie (Tomasello, Gianluca et al. 2017) a její klinický význam pro karcinom jícnu není jednoznačně stanoven. V japonské studii použili neoadjuvantní CHT DCF (docetaxel, cisplatina, fluorouracil) u primárně neresekabilních dlaždicobuněčných karcinomů jícnu. Tato strategie se inspirovala u neresekabilních karcinomů orofaciální oblasti. Po restagingu podstoupili pacienti s resekabilním tumorem operaci nebo pokračovali

v chemoradioterapii, pokud byl tumor nadále neresekabilní. 42 % pacientů podstoupilo konverzní operaci a R0 resekce bylo dosaženo v 39,6 %. Rok po operaci přežívalo 67,9 % pacientů (Yokota, Tomoya et al. 2016). Pacienti, u kterých bylo dosaženo R0 resekce, měli delší tříleté celkové přežívání než pacienti s R1/2 resekci (71,4 % vs. 30,1 %) a také tříleté delší přežívání bez nemoci (61,3 % vs. 25 %). Výskyt vzdálených metastáz nebyl signifikantně významný (Yokota, Tomoya et al. 2020). V obdobně navržené japonské studii primárně neresekabilních karcinomů jícnu bylo po konverzní CHT dosaženo R0 resekci u 50 % pacientů (Takeuchi, Masashi et al. 2019). V současné době je v Japonsku tendence indikovat pacienty s primárně neresekabilním T4 dlaždicobněčným karcinomem jícnu preferenčně k neoadjuvantní CHT DCF s následnou konverzní operací nebo definitivní CHRT než k definitivní CHRT s případnou salvage ezofagektomií. Tyto dva zmíněné postupy porovnává v současné době probíhající randomizovaná studie (Terada, Mitsumi et al. 2019).

1.5.2.1 Neoadjuvantní chemoterapie

Přidání chemoterapie k léčebnému protokolu pokročilých karcinomů jícnu je založeno na dvou klinických studiích: OEO2 a MAGIC. OEO2 studie porovnávala vliv neoadjuvantně podané chemoterapie CF (cisplatina, fluorouracil) oproti primární operaci pacientů s karcinomem jícnu. Podání CHT zlepšilo pětileté přežívání (23 % vs. 17 %) a podíl R0 resekci (60 % vs. 54 %). Pooperační komplikace byly srovnatelné a výsledky byly identické pro AC i SCC (Allum, William H et al. 2009).

Randomizovaná studie MAGIC byla publikována v roce 2006 a prokázala, že přidání tří cyklů chemoterapie ECX (epirubicin, cisplatina, fluorouracil) před a po operaci u pacientů s adenokarcinomem distálního jícnu, GEJ a žaludku zlepšilo pětileté přežívání oproti primárně operovaným (36,3 % vs. 23 %), i když pouze 43,9 % pacientů dokončilo kompletně všech 6 cyklů CHT, nejčastěji z důvodu závažné granulocytopenie. Tento režim se začal používat pro pacienty s AC jícnu a GEJ, i když v původní studii byl podíl AC pouze 25 % pacientů (Cunningham, David et al. 2006). Perioperační CHT se tak stala standardem léčby lokálně pokročilých adenokarcinomů jícnu a GEJ v Evropě.

Francouzská FFCD studie publikovaná v roce 2011 podpořila význam perioperační CHT (fluorouracil a cisplatina) a navíc pacienti s AC distálního jícnu a GEJ tvořili ve studii 75 %. Podání CHT zlepšilo nejenom celkové pětileté přežívání (38 % vs. 24 %), ale i míru R0 resekci

(84 % vs. 73 %) oproti primárně operovaným. Pooperační morbidita se nelišila (Ychou, Marc et al. 2011).

Britská studie z roku 2017 zpochybnila přínos epirubicinu, když porovnávala efekt dvou režimů chemoterapie CF (cisplatina, fluorouracil) a ECX (epirubicine, cislatina a capecitabine). Obě ramena se nelišila v míře pooperačních komplikací, celkového přežívání i R0 resekci (Alderson, Derek et al. 2017).

Německá randomizovaná studie FLOT4 porovnávala efekt nové kombinace chemoterapeutik FLOT (fluorouracil s leukovorinem, oxalplatina, docetaxel) se stávajícím režimem MAGIC (ECF/ECX) u pacientů s adenokarcinomem žaludku a GEJ. U pacientů v režimu FLOT byla dosažena častěji kompletní patologická regrese (PCR, 15 % vs. 6 %), pacienti měli o 15 měsíců delší medián celkového přežívání (50 vs. 35 měsíců) a delší medián přežití bez nemoci (30 vs. 18 měsíců) (Al-Batran, Salah-Eddin et al. 2019).

Na podkladě těchto výsledků se perioperační léčba dle protokolu FLOT etablovala celosvětově jako metoda volby léčby lokálně pokročilých adenokarcinomů jícnu a GEJ.

Zatímco v západních zemích jsou pokročilé dlaždicobuněčné karcinomy léčeny multimodální chemoradioterapií, v asijských zemích a především v Japonsku je preferována neoadjuvantní chemoterapie samotná s preferencí režimů založených na docetaxelu, hlavní složce režimu FLOT. U více než 60 % pacientů došlo k regresi tumoru (Hara, Hiroki et al. 2013, Koyanagi, Kazuo et al. 2020).

1.5.2.2 Neoadjuvantní chemoradioterapie

Trimodální léčba zahrnující chemoterapii, radioterapii a operaci byla zavedena na podkladě studií, které prokázaly výhodu chemoradioterapie nad samotnou radioterapií (al-Sarraf, M et al. 1997). Chemoterapie kromě systémového efektu na metastatické buňky má také schopnost potencovat protinádorový efekt radioterapie. U analogů platiny (cisplatina, karboplatina) se předpokládá, že radioterapie zvyšuje jejich vychytávání do nádorových buněk, inhibuje opravy DNA a zastavuje buněčné dělení (Yang, L X et al. 1995, Amorino, G P et al. 1999). První randomizovaná studie, která prokázala přínos neoadjuvantní CHRT (2 cykly 5-FU s cisplatinou a 40 Gy) oproti operaci samotné u pokročilých adenokarcinomů jícnu, byla publikována v roce 1996. Pacienti v rameni s nCHRT dosáhli kompletní patologické regrese ve 25 % a měli vyšší tříleté přežívání (32 % vs. 6 %) (Walsh, T N et al. 1996). Randomizovaná

studie EORTC porovnávající skupinu s podáním neoadjuvantní CHRT (dvoutýdenní cykly RT 3,7 Gy/den s časovým rozestupem 2 týdnů, podání cisplatiny na začátku obou týdnů RT) se skupinou primárně operovaných pacientů se SCC jícnu byla zastavena z důvodu vysoké mortality ve skupině s nCHRT. Ačkoliv v této skupině kombinované terapie bylo dosaženo PCR ve 26 %, mortalita po 55 měsících se nelišila od mortality primárně operovaných. CHRT snížila mortalitu spojenou s karcinomem (cancer-related mortality), ale zvýšila pooperační mortalitu z jiných příčin. Možnou příčinou vyšší mortality ve skupině s CHRT byla vyšší dávka RT v jedné frakci (3,7 Gy), dvoutýdenní přestávka mezi cykly ozáření a použití cisplatiny v monoterapii (Bosset, J F et al. 1997). Bylo prokázáno, že SCC jícnu je velmi radiosenzitivní a že RT má schopnost dosáhnout u ¼ pacientů kompletní patologické regrese. Na druhou stranu podání RT má negativní vliv na okolní tkáň a zvyšuje pooperační morbiditu a tím i mortalitu. Bylo potřeba předdefinovat celkovou dávku RT, dávku na jednu frakci a složení komkomitantně podávané chemoterapie. Také další randomizovaná studie TROG neprokázala přínos nCHRT (35 Gy v 15 dávkách + jeden cyklus cisplatiny s 5-FU) na celkové přežívání (OS) nebo přežívání bez nemoci (DFS) oproti primárně operovaným s pokročilým karcinomem jícnu (37 % SCC, 62 % AC) obecně, nicméně v subanalýze pacientů se SCC byl pozitivní efekt CHRT na přežívání prokázán (Burmeister, Bryan H et al. 2005). Studie byla kritizována pro použití nižší celkové dávky RT (35 Gy) a podání pouze jedné série CHT. Neoadjuvantní CHRT začala být globálně akceptována po roce 2012, kdy byla publikována studie CROSS (van Hagen, P et al. 2012). Porovnávala efekt předoperačně podaných 5 cyklů CHT (karboplatina a paclitaxel) konkomitantně podaných s 41,4 Gy oproti primární operaci u lokálně pokročilých karcinomů jícnu (75 % AC, 23 % SCC). Podání CHRT zlepšilo pětileté přežívání (47 % vs. 33 %) i podíl R0 resekcí (92 % vs. 69 %). Kompletní patologické regrese dosáhlo 23 % pacientů s AC a 49 % pacientů se SCC. Efekt CHRT byl patrnější u SCC, kde došlo k výraznějšímu zlepšení mediánu přežívání (82 vs. 21 měsíců) než u AC (43 vs. 27 měsíců). Nebyl signifikantní rozdíl v pooperačních komplikacích a mortalitě (Shapiro, Joel et al. 2015). Neoadjuvantní CHRT dle protokolu CROSS tak začala být akceptována ve většině západního světa jako metoda volby pro léčbu pokročilého operabilního karcinomu jícnu. Je však patrné, že větší přínos má pro SCC než pro AC. Adenokarcinom není tak radiosenzitivní jako SCC a je možné, že redukováná dávka systémové CHT u neoadjuvantní CHRT (oproti perioperační CHT) nemá takový protektivní vliv na výskyt vzdálených metachronních metastáz. Z výsledků dlouhodobého sledování pacientů CROSS studie vyplývá, že celkový výskyt vzdálených

metastáz byl po CHRT nižší, ale nebyl signifikantně nižší po dvou letech oproti skupině primárně operovaných.

Další výzkum zkoumal ideální kombinaci chemoterapie a radioterapie. Studie NEOSCOPE randomizovala pacienty na skupiny neoadjuvantní CHT oxalplatina-capecitabine nebo karboplatina-paclitaxel podané konkomitantně s radiací 45 Gy. Pacienti ve skupině karboplatina-paclitaxel dosáhli vyšší míry kompletní patologické regrese a celkového přežívání. V obou ramenech studie byly vzdálené metastázy dvakrát čtenější než lokoregionální recidivy. Zájem by se tak měl soustředit na optimalizaci složení systémově působící chemoterapie (Mukherjee, Somnath et al. 2021).

V posledních letech se začíná používat protonová radioterapie namísto konvenční fotonové radioterapie. Fotonový svazek je tkání systematicky zeslabován a velké množství své energie odevzdá na povrchu těla. Naproti tomu protonový svazek předá na povrchu těla méně energie a jeho intenzita s hloubkou roste. Maximum své energie předá v cílové oblasti (v oblasti Braggova píku) a za ní již energii nepředává. Protonová terapie tedy umožňuje dosáhnout dostatečné radiační dávky v cílové oblasti a zároveň snížit celkový ozáření objem okolních tkání, což snižuje především nežádoucí plicní a kardiální účinky (Gergelis, Kimberly R et al. 2020).

1.5.2.3 Neoadjuvantní chemoterapie versus chemoradioterapie

Otázka, jaký typ neoadjuvance je nejvhodnější pro adenokarcinomy jícnu, tedy zatím nebyla jednoznačně zodpovězena. Starší metaanalýzy randomizovaných studií prokazovaly, že chemoterapie a chemoradioterapie jsou vhodné pro adenokarcinomy, zatímco u dlaždicobuněčných karcinomů je efektivnější CHRT než CHT (Gebbski, Val et al. 2007, Sjoquist, Katrin M et al. 2011). Retrospektivní multicentrická analýza CHRT versus CHT u adenokarcinomů jícnu neprokázala rozdíl u celkového přežívání ani přežívání bez nemoci, ale CHRT signifikantně zvyšovala podíl R0 resekcí a kompletní patologické regrese (Markar, S R et al. 2017). Studie POET porovnávala efekt neoadjuvantní CHRT oproti CHT u adenokarcinomů jícnu. CHRT signifikantně zlepšila medián celkového přežívání i přežívání bez nemoci, ale pooperační mortalita v této skupině dosáhla 10,2 % oproti skupině s CHT, kde dosáhla 3,8 % (Stahl, Michael et al. 2017). Také studie NeoRes prokázala pro smíšenou skupinu AC (73 %) a SCC (27 %) vyšší míru kompletní patologické regrese a R0 resekcí po

CHRT oproti CHT, ale bez vlivu na celkové přežívání a výskyt vzdálených metastáz. Výskyt pooperačních komplikací se sice nelišil, ale komplikace po CHRT byly závažnější (Klevebro, F et al. 2016, von Döbeln, G A et al. 2019). V současné době probíhají další randomizované studie, které porovnávají neoadjuvantní chemoterapii s chemoradioterapií. Studie NExT porovnává dva různé protokoly CHT s CHRT pro pokročilé karcinomy jícnu (Nakamura, Kenichi et al. 2013). Studie ESOPEC a Neo-Aegis porovnávají CHT dle protokolu FLOT s CHRT v režimu CROSS u pokročilých adenokarcinomů jícnu (Hoepfner, Jens et al. 2016, Reynolds, J V et al. 2017). Recentně publikované předběžné výsledky Neo-Aegis studie neodhalily žádný důkaz, že by perioperační chemoterapie byla horší než multimodální terapie, a to navzdory lepší lokální nádorové odpovědi v rameni CROSS (Reynolds John V. et al. 2021). Mezinárodní studie TOPGEAR porovnává efekt perioperační CHT ECF (epirubicin, cisplatina, 5-fluorouracil) samotné a v kombinaci s neoadjuvantní CHRT u adenokarcinomů žaludku a GEJ. Dle předběžných výsledků je podání CHRT dobře tolerováno a nezvyšuje pooperační morbiditu (Leong, Trevor et al. 2017). Nejnovější randomizovaná multicentrická studie RACE porovnává perioperační CHT dle protokolu FLOT (4 cykly před i po operaci) s režimem kombinujícím předoperačně indukční 2 cykly FLOT s CHRT (oxalplatin, 5-FU, 45 Gy) a pooperačním podáním 4 cyklů FLOT, u adenokarcinomů GEJ (Lorenzen, Sylvie et al. 2020).

V těchto studiích bylo reflektováno, že podaná CHT v režimu CROSS nebyla dostatečná pro systémovou kontrolu onemocnění, a kombinují tak předoperační CHRT s etablovanými chemoterapeutickými schémata. Na podkladě jejich výsledků by mohl být v budoucnu jasně definován ideální režim neoadjuvantní léčby lokálně pokročilých adenokarcinomů jícnu.

1.5.2.4 Definitivní chemoradioterapie, salvage ezofagektomie, konverzní léčba

U pacientů neúnosných operaci je indikována definitivní chemoradioterapie nebo chemoterapie. Pacienti s karcinomem krčního jícnu jsou také léčeni definitivní chemoradioterapií, protože případná operace by zahrnovala laryngektomii s nutností terminální tracheostomie, což je mutilující výkon výrazně snižující kvalitu života. Vzhledem k relativně vysoké míře kompletní patologické regrese po chemoradioterapii je otázkou, zdali multimodální terapie s následnou operací zatíženou vysokou morbiditou a nezanedbatelnou mortalitou prodlužuje celkové přežívání pacientů.

Mezinárodní doporučené postupy akceptují obě léčebné modalitty (neoadjuvantní chemoradioterapie následovaná operací a definitivní chemoradioterapie) jako léčbu lokálně pokročilého dlaždicobuněčného karcinomu jícnu (Vellayappan, Balamurugan A et al. 2017). Tyto závěry jsou založeny na výsledcích dvou randomizovaných studií. Německá studie z roku 2005 porovnávala podání CHRT (cisplatina, etoposid, 40 Gy) následované operací oproti navýšení RT na 60 Gy. Pacienti obou skupin dostali indukční CHT (fluorouracil, leucovorin, etoposid, cisplatina). Operovaní pacienti měli vyšší dvouleté přežívání bez nemoci (DFS 60 % vs. 40 %), ale celkové přežívání nebylo vyšší a hospitalizační mortalita dosáhla 11,3 % (Stahl, Michael et al. 2005). Ve francouzské studii z roku 2007 pacienti s pokročilým karcinomem jícnu (90 % SCC, 10 % AC) podstoupili chemoradioterapii. Z etických důvodů pouze respondeři byli randomizováni a buď podstoupili operaci, nebo pokračovali v CHRT. Operace nezlepšila celkové přežívání, ale snížila výskyt lokoregionální rekurence (Bedenne, Laurent et al. 2007). Recentní kohortová studie americké Národní databáze karcinomů (NCDB, National Cancer Database) porovnávající 19 532 pacientů prokázala skoro dvojnásobnou dobu přežívání pacientů operovaných po neoadjuvantní CHRT oproti skupině s definitivní CHRT a podpořila ezofagektomii jako standardní součást léčby pokročilých karcinomů jícnu, a to i vzhledem ke stále se snižující pooperační mortalitě (Kamarajah, Sivesh K et al. 2022). Současné protokoly doporučují dávku 50,4 Gy pro definitivní CHRT. Ve studii ARTDECO porovnávající různé dávky RT (61,6 Gy vs. 50,4 Gy) vyšší dávka radioterapie nevedla ke snížení výskytu lokálních recidiv, a naopak zvýšila počet závažných vedlejších efektů RT (Hulshof, Maarten C C M et al. 2021).

Salvage ezofagektomie, tzv. záchranná resekce jícnu, je rezervována pro pacienty s dlaždicobuněčným karcinomem po definitivní chemoradioterapii, kteří mají perzistující karcinom nebo u kterých se objeví recidiva karcinomu. Salvage ezofagektomie nabízí lepší dlouhodobé přežívání než druhá linie onkologické léčby, ale je zatížena vysokou mortalitou kolem 10 % (Kumagai, K et al. 2016).

U pacientů s klinickou regresí je nutné ověřit, zdali u nich došlo také ke kompletní patologické regresi. K tomuto účelu byla navrhnutá studie PreSANO (Noordman, Bo Jan et al. 2018). Jedná se o multicentrickou holandskou studii pacientů se SCC i AC po neoadjuvantní CHRT. Pacienti se zřejmou klinickou regresí byli vyšetřováni 6 a 12 týdnů po ukončení neoadjuvance endoskopicky s odběrem vícečetných biopsií zasahujících i do submukózy (bite-on-bite biopsie), endosonograficky s případnou biopsií podezřelých lymfatických uzlin

tenkou jehlou a skenování pomocí PET-CT k odhalení vzdálených metastáz. Metoda prokázala 90% senzitivitu detekce reziduálního tumoru pro stadia regrese TRG 3-4 (Tumor Regression Grade), tedy reziduum nádorových buněk > 10 %, ale nízkou senzitivitu vyloučení minimální reziduální nemoci, kdy se jednalo o ojedinělé nádorové buňky nacházející se často v submukóze. Výsledky studie PreSANO iniciovaly randomizovanou studii SANO, která má za cíl prokázat stejnou efektivitu důsledného sledování pacientů s kompletní klinickou odpovědí po neoadjuvantní chemoradioterapii oproti přidané ezofagektomii, pokud nebude po 12 týdnech prokázána reziduální nemoc (Noordman, Bo Jan et al. 2018). Podobná studie zaměřená pouze na dlaždicobuněčné karcinomy probíhá ve čtyřech asijských centrech. Pokud bude dosažena senzitivita detekce reziduální nemoci (> 10 % nádorových buněk) nad 80,5 %, bude převedena na prospektivní randomizovanou studii porovnávající „adjuvantní“ ezofagektomii oproti důslednému sledování (Zhang, Xiaobin et al. 2020). V Holandsku provedli dotazníkovou studii (Noordman, B J et al. 2018) preferencí mezi pacienty s karcinomem jícnu po neoadjuvantní CHRT, kdy jim představili několik možných scénářů založených na pětiletém přežití, predikci krátkodobé a dlouhodobé změny kvality života, dlouhotrvajícím riziku indikace ezofagektomie při recidivě nádoru a frekvenci endoskopických a zobrazovacích metod v rámci sledování. Pacienti byli v 16 % ochotni „obětovat“ pětileté přežívání za možnost snížení rizika operace ze 100 % (standardní postup po nCHRT) na 35 % (operace pouze v případě recidivy). Nejnovější a nejrozsáhlejší mezinárodní multicentrickou randomizovanou studii porovnávající neoadjuvantní CHRT následovanou operací s definitivní CHRT s případnou salvage ezofagektomií organizuje švédská univerzita Karolinska, přičemž cílový počet je 1 200 pacientů (Karolinska UH, NCT04460352).

1.5.2.5 Onkologické léčba a gender

Vzhledem k rozdílné incidenci karcinomu jícnu a GEJ u obou pohlaví jsou ve studiích zahrnuti většinou muži, kteří tvoří 75-80 % pacientů. Analýzy, které se zaměřily na potenciálně rozdílný benefit onkologické terapie pro obě pohlaví, přinesly rozporuplné výsledky. Ve studii CROSS profitovaly z neoadjuvantní CHRT více ženy, zatímco ve studii NeoSCOPE měly ženy signifikantně horší celkové přežívání. V retrospektivní studii prokazující přínos indukční CHT ve srovnání s neoadjuvantní CHRT bylo ženské pohlaví spojeno s lepším přežíváním a

signifikantně vyšší mírou kompletní patologické regrese (Ho, Felix et al. 2021). Další studie včetně analýz prospektivních studií prokazují, že ženy s adenokarcinomem jícnu či GEJ hůře tolerují neoadjuvantní CHT, mají vyšší počet závažných toxických nežádoucích účinků a méně jich tedy dokončí CHT. Navzdory tomu dosahují častěji kompletní patologické regrese a mají lepší celkové přežívání (Davidson, Michael et al. 2019, Athauda, Avani et al. 2020).

Studie CRITICS, porovnávající adjuvantní CHT s adjuvantní CHRT po předešlé neoadjuvantní CHT následované operací u pacientů s adenokarcinomem žaludku a GEJ, neprokázala rozdíl v celkovém přežívání u obou ramen. Nicméně subanalýza odhalila, že muži dosahují lepšího přežívání s adjuvantní CHRT, zatímco ženy s adjuvantní CHT (Cats, Annemieke et al. 2018).

Příčina těchto rozdílů není zatím zřejmá, ale může se na tom spolupodílet rozdílná farmakokinetika a farmakodynamika u obou pohlaví. Clearance 5-fluorouracilu je o 20 % vyšší u mužů a ženy tak dosahují vyšších plazmatických hladin. Clearance SN-38, aktivního metabolitu irinotekanu, je o 30-38 % menší u žen než u mužů (Zander, Thomas, and Anna Dorothea Wagner 2022). V budoucnosti tak budou potřeba další studie, které lékařům pomohou pochopit biologickou podstatu odlišného působení onkologické terapie dle pohlaví a umožní jim cílit terapii nejenom dle histologického typu a stagingu.

1.5.3 Metastatický karcinom jícnu (cM+)

Podle americké databáze SEER je skoro 28 % adenokarcinomů a 37 % dlaždicobuněčných karcinomů jícnu diagnostikovaných ve stadiu IV, tedy jako metastatických. Pětileté přežívání metastatického karcinomu jícnu je kolem 5 % (Then, Eric Omar et al. 2020). Pacienti s generalizovaným karcinomem jícnu nejsou indikováni k operaci, ale k paliativní chemoterapii. Ta je efektivnější u adenokarcinomů než u dlaždicobuněčných karcinomů. Používá se kombinace cisplatiny a 5-fluorouracilu nebo oxaliplatina s fluoropyrimidinem. K zajištění nutrice při progredující dysfagii se zavádějí metalické samoexpandibilní stenty. Alternativou je brachyterapie, kterou lze aplikovat i po předešlé radioterapii. Randomizovaná studie porovnávala zavedení stentu s jednorázovou brachyterapií 12 Gy pro řešení dysfagií u inoperabilního karcinomu jícnu. Zavedení stentu obnoví polykání rychleji, ale brachyterapie má dlouhodobější úlevu od dysfagie a má méně komplikací než zavedení stentu, především pozdního krvácení (5 % vs. 13 %). Dotazníky kvality života také favorizovaly brachyterapii (Homs, Marjolein Y V et al. 2004). U dysfagických pacientů s

karcinomem krčního jícnu je možné zajistit výživu operačním založením nutriční gastrostomie nebo jejunostomie.

Lymfatická drenáž jícnu je odlišná pro jeho různé anatomické části. Horní část je drénována do hlubokých krčních uzlin, střední část do ductusthoracicus, subkarnárních a paratracheálních LU a do LU kolem hlavních bronchů. Dolní část jícnu je drénována do oblasti truncuscoeliacus. V případě vysokého nitrobřišního tlaku nebo obliteraci lymfatických cév se může směr obrátit a karcinomy GEJ mohou mít spádovou lymfatickou drenáž do mediastinálních a krčních LU (Wang, Yichun et al. 2018). Cílové orgány vzdálených metastáz se u obou histologických typů karcinomů jícnu liší. Adenokarcinom metastazuje nejčastěji do jater a mozku, méně do plic a kostí (Ai, Dashan et al. 2017). Dlaždicobuněčný karcinom metastazuje nejčastěji do plic. Vyšší grading tumoru a mladší věk jsou negativní prognostické faktory pro vznik metastáz. Jejich lokalizace nemá vliv na celkové přežívání, ale zasažení každého dalšího orgánu metastázou snižuje celkové přežití o měsíc. Pacienti s jedním zasaženým orgánem přežívali 5 měsíců, zatímco se čtyřmi orgány pouze 2 měsíce (Wu, San-Gang et al. 2018). Pacienti s mnohočetnými metastázami jsou kontraindikováni k operaci a podstupují systémovou léčbu. Nicméně pacienti s ojedinělými metastázami by mohli profitovat z lokální léčby, ať už chirurgické resekce, stereotaktické radioterapie (Leksellův gamma nůž, kybernetický nůž – CyberKnife) nebo radiofrekvenční ablace. Koncept oligometastatického onemocnění (oligometastaticdisease – OMD) byl prvně popsán v roce 1995 (Hellman, S, and R R Weichselbaum 1995). Přestavuje tranzitorní stav mezi lokalizovaným a systémovým onemocněním. Koncept byl přepracován v roce 2011 stejnými autory, kdy rozlišili skutečné a indukované oligometastatické onemocnění.

Skutečná oligometastáza je přítomna, když primární nádorové buňky mají sníženou schopnost metastazovat, takže oligometastatický stav je potenciálně léčitelný. Naproti tomu indukovaná oligometastáza je nádorový stav s rozsáhlými maligními schopnostmi, který je potlačován pouze systémovou terapií (Weichselbaum, Ralph R, and Samuel Hellman 2011).

Zatím nebyla publikována žádná randomizovaná studie lokální léčby oligometastatického karcinomu jícnu, ale některé studie signalizují, že celkové přežívání může být zlepšeno operací oproti pouze systémové léčbě. Ve studii z roku 2017 pacienti s karcinomem GEJ nebo žaludku s metastázou jednoho orgánu nebo mimo spádové retroperitoneální LU, bez progrese po neoadjuvantní CHT dle protokolu FLOT profitovali z resekce primárního tumoru a metastazektomii s dosaženým mediánem celkového přežívání 31,3 měsíců (Al-Batran,

Salah-Eddin et al. 2017). V souboru odoperovaných pacientů se SCC jícnu, u kterých bylo ≤ 3 metachronních metastáz ošetřeno stereotaktickou radioterapií a polovina z těchto pacientů následně podstoupila adjuvantní chemoterapii, bylo dosaženo mediánu přežití 24,6 měsíců (Liu, Qi et al. 2020). Interpretaci těchto jednotlivých studií a jejich převedení do klinické praxe brání různé definice oligometastatického onemocnění. V letošním roce byl publikován systematický přehled studií, ve kterých autoři buďto definovali, nebo lokálně léčili pacienty s oligometastatickým karcinomem jícnu a žaludku. Dalším záměrem bylo porovnat výsledky lokální a systémové léčby provedením metaanalýzy celkového přežívání (Kroese, Tiuri E et al. 2022). Oligometastatické postižení jícnu bylo definováno jako přítomnost ≤ 3 metastatických ložisek v pouze jednom postiženém orgánu nebo postižení maximálně jedné mimospádové LU. Orgánově specificky se jedná o výskyt ≤ 3 metastáz v obou lalocích jater, ≤ 2 metastáz v plicích unilaterálně, postižení maximálně jedné mimospádové LU, ≤ 2 metastáz v mozku nebo metastázy v obou nadledvinách. Lokální léčba oligometastatického postižení zlepšovala celkové přežití v porovnání se systémovou léčbou (HR 0,47, 95 % CI: 0,30-0,74). Ghaly ve svém souboru pacientů léčených multimodálně pro metachronní oligometastatické onemocnění po resekci jícnu pro karcinom neprokázal signifikantní rozdíl v přežívání dle lokalizace metastázy. Signifikantním prediktorem přežívání byla časová latence recidivy od operace. Recidiva do 12 měsíců signifikantně zhoršovala prognózu přežití (Ghaly, Galal et al. 2018). Jiné retrospektivní analýzy prokázaly více než dvojnásobně delší přežívání po resekci metachronních metastáz plic než jater (Ichida, Hirofumi et al. 2013).

Vzhledem k nedostatku dostupných dat z randomizovaných studií zůstává nejasné, zda agresivní chirurgický přístup v případě omezených metastáz prodlužuje přežití pacientů, nebo zda jsou dostupné výsledky přežití ovlivněny výběrem pacientů. Pacienti s oligometastatickým onemocněním by měli být prodiskutováni v rámci multidisciplinárního týmu jako součást individualizovaného léčebného přístupu. Kromě toho nelze ignorovat význam chirurgické resekce jako součásti multimodální terapie u oligometastatického karcinomu jícnu. V současné době probíhá multicentrická randomizovaná prospektivní studie Renaissance, která randomizuje pacienty s oligometastatickým adenokarcinomem GEJ a žaludku po neoadjuvantní CHT 4 cyklů FLOT (s přidáním trastuzumabu v případě HER-2 positivity) bez progresu buďto k resekci s metastazektomií a adjuvantní CHT, nebo k pokračování v CHT. Primárním cílem je posouzení celkového přežití (Al-Batran, Salah-Eddin

et al. 2017). Výsledky této studie jsou netrpělivě očekávány a pravděpodobně povedou k aktualizaci stávajících doporučených postupů.

1.5.4 Imunoterapie a cílená terapie v neoadjuvantním a adjuvantním režimu

Nástup imunoterapie způsobil revoluci v protinádorové léčbě. Molekuly, které řídí aktivaci a inhibici imunitních buněk, takzvané imunitní kontrolní body (immune checkpoints), jako je protein programované smrti-1 (PD-1), jeho ligandy (PD-L1 a PD-L2) a cytotoxický protein 4 asociovaný s T lymfocyty (CTLA-4) byly rozsáhle studovány u nádorových onemocnění. Nádorové buňky mohou vyvolat inhibici imunitních T buněk různými mechanismy, které vedou k indukci zvýšené exprese inhibičních molekul na T buňkách. To má za následek útlum cytotoxických funkcí T buněk, a tedy i oslabení protinádorové imunitní odpovědi. Vývoj protilátek zaměřených na inhibiční dráhy imunitních kontrolních bodů způsobil revoluci v moderní onkologické praxi.

Dosud se většina imunoterapeutických studií zabývala inhibitory kontrolních bodů, takzvanými checkpoint inhibitory (ICIs – Immune Checkpoint Inhibitors), které prokázaly trvalé výsledky u řady nádorů (Topalian, Suzanne L et al. 2015). Navzdory širokému a rostoucímu využití checkpoint inhibitorů pouze podskupina pacientů vykazuje odpověď na tuto léčbu (Restifo, Nicholas P et al. 2016). V současnosti tedy výzkum biomarkerů, které budou účinně predikovat, kteří pacienti mohou z této terapie profitovat, představuje jeden z nejvýznamnějších směrů onkoimunologie. Několik takových biomarkerů bylo identifikováno v posledních letech a dnes je již známo, že dobrá odpověď na terapii checkpoint inhibitory bývá pozorována u pacientů s vysokou infiltrací nádoru T buňkami, s vysokou mutační náloží nádoru a s vysokou expresí checkpoint molekul.

Většina studií zkoumající vztah imunoterapie karcinomu jícnu a GEJ se zaměřila na léčbu druhé nebo třetí linie pokročilého/metastatického onemocnění, a ačkoli jsou tyto studie povzbudivé, výsledky ukázaly často pouze mírné zvýšení přežití ve srovnání se standardní onkologickou léčbou. Dále bylo prokázáno, že chemoterapie, a hlavně radioterapie mohou kromě cytotoxického účinku také potencovat imunogenní vlastnosti nádoru tím, že uvolní z nádoru antigenní mediátory zánětu, které aktivují vlastní imunitní systém včetně podpory vlastních antigen prezentujících buněk (APC) (Lonie, James M et al. 2021). Pacienti po CHRT vykazovali zvýšení exprese PD-L1 (programmed death ligand) než před CHRT, a to ze 44 % na

77 %. Tento efekt nebyl patrný po podání samotné CHT, což ukazuje na schopnost radioterapie potencovat imunitní odpověď (Kelly, Ronan J et al. 2018).

Trastuzumab je monoklonální protilátka schopná inhibovat lidský epidermální růstový faktor (Human Epidermal growth factor Receptor 2 – HER2), který je zodpovědný za buněčnou proliferaci a inhibici apoptózy buněk. Studie TOGA prokázala, že přidání trastuzumabu k CHT u pacientů s generalizovaným adenokarcinomem jícnu a žaludku s pozitivní expresí molekuly HER2 zlepšuje přežívání, a stalo se tak linií první léčby u těchto pacientů (Bang, Yung-Jue et al. 2010). Inhibitor endoteliálního růstového faktoru (vascular endothelial growth factor – VEGF) ramucirumab v kombinaci s paclitaxelem se stal linií druhé léčby generalizovaného adenokarcinomu jícnu na podkladě RAINBOW studie (Wilke, Hansjochen et al. 2014). Přidání trastuzumabu a pertuzumabu (jiný inhibitor HER2) k perioperačnímu režimu FLOT u resekabilních adenokarcinomů jícnu zlepšilo celkové přežívání, zvýšilo podíl kompletních patologických remisí (35 % vs. 12 %) a podíl patologicky negativních LU (ypN0 68 % vs. 39 %) (Hofheinz RD, et al. 2020). Přidání pembrolizumabu k CHT zlepšilo přežívání u pacientů s generalizovaným karcinomem jícnu při selhání druhé linie léčby a byl v roce 2017 schválen FDA (U. S. Food and Drug administration) pro léčbu v USA (Fuchs, Charles S et al. 2018).

Efekt monoklonálních protilátek prokázaný u generalizovaných karcinomů se začal zkoumat i u kurabilních stadií. Ve studii CHECKMATE-577 pacienti po neoadjuvantní CHRT a operaci, kteří nedosáhli kompletní patologické regrese, byli léčeni buď nivolumabem (anti-PD-1 monoklonální protilátka), nebo placebem. Pacienti s nivolumabem dosáhli dvojnásobného přežívání bez nemoci (22,4 vs. 11 měsíců), ale výskyt vedlejších účinků byl trojnásobný, a proto byl nábor do studie zastaven (Kelly, Ronan J et al. 2021). Tato studie potvrdila dobrý efekt nivolumabu v adjuvantní léčbě po neoadjuvantní CHRT a znamená posun v adjuvantní léčbě karcinomu jícnu. Nivolumab byl na podkladě výsledků studie ATTRACTION-3 v Japonsku schválen jako druhá linie léčby u pacientů se SCC jícnu (Kato, Ken et al. 2019).

Otázkou je, zdali je možné podat imunoterapii předoperačně u kurabilních stadií a jaký bude vliv na výskyt pooperačních komplikací, především na hojení anastomózy a systémovou nebo orgánově specifickou zánětlivou odpověď. Pacienti s adenokarcinomem jícnu a žaludku byli randomizováni a podstoupili samotnou neoadjuvantní CHT (epirubicin + cisplatina + capecitabine) nebo v kombinaci s inhibitorem endoteliálního růstového faktoru bevacizumabem. Tříleté přežívání se nelišilo, ale pacienti ve skupině s bevacizumabem měli víc než dvojnásobný výskyt dehiscence anastomózy (24 % vs. 10 %) a nábor do studie byl

zastaven (Cunningham, David et al. 2017). Studie s neoadjuvantně přidaným pembrolizumabem k CHRT u pacientů se SCC jícnu sice neprokázala statisticky významný rozdíl v pooperačních komplikacích, ale 2/16 (12,5 %) pacientů s pembrolizumabem zemřelo na respirační selhání (ARDS, acute respiratory distress syndrom) (Park, Seong Yong et al. 2020). Použití inhibitorů kontrolních bodů je v nezanedbatelné míře zatíženo imunitně podmíněnými nežádoucími efekty, které vyplývají z jejich mechanismu účinku. Jednotlivé látky mají různou toxicitu, nejvyšší je však při jejich použití v kombinaci (Wang, Daniel Y et al. 2018).

V současné době probíhají studie s dalšími monoklonálními protilátkami, ať už samotnými, ve vzájemné kombinaci, nebo v kombinaci s etablovanými chemoterapeutickými režimy (Rosenbaum, Matthew W, and Raul S Gonzalez 2021).

S lepšími znalostmi o molekulách určujících reakci imunitního systému na nádor a profilech nádorových antigenů a mechanismech, které řídí účinné protinádorové T buněčné odpovědi, se začínají zkoumat personalizované terapie (Palucka, A Karolina, and Lisa M Coussens, 2016). Protinádorová léčba terapeutickými vakcínami a adoptivními buněčnými terapiemi (ACT – adoptive cellular therapy) může být využita ke zvýšení protinádorové imunitní odpovědi a její aktivaci prostřednictvím využití imunogenních nádorových antigenů.

Terapeutické protinádorové vakcíny fungují tak, že připravují hostitelský imunitní systém, aby se zaměřil na nádorové buňky prostřednictvím rozpoznávání antigenu, a jejich cílem je vytvořit trvalé nádorově specifické paměťové T buněčné odpovědi (Waldman, Alex D et al. 2020). Výzkum protinádorových vakcín u karcinomů jícnu je zaměřený především proti SCC. Některé studie prokázaly proveditelnost a bezpečnost peptidových vakcín, ale pouze malá podskupina pacientů vykazovala klinickou odpověď (Kono, Koji et al. 2012). V prospektivní studii pacientů se SCC jícnu odoperovaných po neoadjuvantní terapii s nálezem pozitivních uzlin (pN+) prokázala skupina očkovaných tumor-specifickými peptidy delší přežívání bez nádoru (cancer-specific survival) a vyšší hladiny cytotoxických T lymfocytů (Yasuda, Takushi et al. 2022).

Adoptivní buněčná terapie (ACT), která zahrnuje periferní reinfuzi autologních nebo alogenních imunitních buněk, které byly primárně aktivované a pomnožené ex vivo, prokázala trvalou odezvu u některých typů malignit. ACT může zahrnovat izolaci autologních T buněk, které jsou následně geneticky upraveny tak, aby exprimovaly konvenční alfa-beta T buněčné receptory (TCR) nebo chimérické antigenní receptory (CAR) kódující antigen-

specifické variabilní domény. Ačkoli byly pozorovány dobré klinické odpovědi u hematologických malignit, úspěšná aplikace terapie CAR T buňkami u solidních nádorů zůstává v nedohlednu (Waldman, Alex D et al. 2020). Ve studii pokročilých nebo recidivujících karcinomů jícnu došlo po lokoregionální aplikaci autologních T lymfocytů stimulovaných nádorem u 50 % pacientů k regresi, ale u 50 % k progresi onemocnění (Toh, U et al. 2000). Studie CAR T buněk zaměřená na specifický antigen (MAGE-A4) u pacientů s recidivujícím SCC jícnu zjistila, že u 70 % pacientů došlo k progresi onemocnění do dvou měsíců, zatímco 30 % přeživalo dva roky po léčbě (Kageyama, Shinichi et al. 2015).

1.5.5 Chirurgická léčba

Chirurgická léčba je považována za základní kurativní léčbu karcinomu jícnu. K operaci jsou indikováni interně únosní pacienti po neradikální endoskopické resekci časného karcinomu, s lokalizovaným onemocněním nevhodným k endoskopické resekci, s lokálně pokročilým karcinomem po neoadjuvantní léčbě a recentně i selektovaní pacienti s oligometastatickým onemocněním bez progresu po neoadjuvanci. Pro pacienty s karcinomem stadia T2N0 byly v minulosti prováděny vícečetné studie zkoumající přínos podání neoadjuvantní terapie. Podle výsledků metaanalýzy z roku 2018 podání neoadjuvance u stadií T2N0 nezlepšuje celkové přežívání ani nesnižuje výskyt recidiv (Mota, F C et al. 2018), a pacienti by tedy měli podstoupit primární operaci. Principem operace je odstranění nádoru jícnu včetně makroskopicky nepostižené části jícnu nad nádorem a odstranění kardie a části proximálního žaludku s malou kurvaturou včetně provedení spádové lymfadenektomie.

Pacienti s karcinomem jícnu a kardie Siewert I (epicentrum nádoru 1-5 cm nad GEJ) jsou indikováni k ezofagektomii. Karcinomy Siewert III (epicentrum nádoru aborálněji až 2 cm od GEJ) se řeší jako karcinomy žaludku (totální) gastrektomií. Právě karcinomy kardie Siewert II (epicentrum nádoru mezi 1 cm nad a 2 cm pod GEJ) jsou řešeny buďto transtorakální ezofagektomií nebo gastrektomií s transhiatální resekci jícnu. Doporučené postupy umožňují použít oba typy operací, protože nebyl prokázán rozdíl v dlouhodobém přežívání. Právě probíhá randomizovaná studie porovnávající oba přístupy se zaměřením na dlouhodobé přežívání, dosažitelnost R0 resekce a postižení LU, která by měla rozhodnout o optimálním přístupu k těmto nádorům (Leers, Jessica M et al. 2020).

Základním cílem operace je dosažení R0 resekce s negativními resekčními okraji. Dosažení R0 resekce je zásadní prognostický faktor celkového přežívání a snížení lokální recidivy i vzdálených metastáz (Chan, D S Y et al. 2013, Markar, Sheraz R et al. 2016). Jako náhrada jícnu se nejčastěji používá staplerytubulizovaný žaludek, tedy jeho velká křivatura zásobená pravým gastroepiploickým cévním svazkem. V případě, že nelze žaludek použít (stav po resekci žaludku, infiltrace žaludku nádorem), provádí se náhrada jícnu exkludovanou kličkou jejunu pro nádory distálního jícnu s anastomózou pod bifurkací trachey nebo tlustým stěvem pro orálněji lokalizované nádory jícnu.

1.5.5.1 Transorakální vs. transhiatální přístup

Resekci jícnu lze provést jako dvoudutinový výkon (transtorakální ezofagektomie – TTE) z laparotomie a pravostranné torakotomie s konstrukcí anastomózy buďto v hrudníku (Ivor-Lewis operace) nebo na krku z přídatné krční incize (McKeown operace). Dalším možným přístupem je transhiatální ezofagektomie (THE) s odstraněním jícnu natupo ze zadního mediastina skrz rozšířený hiatusesophagealis bez otevření dutiny hrudní s konstrukcí krční anastomózy. U nádorů distálního jícnu lze použít levostrannou torakofrenolaparotomii, kterou se z jednoho řezu zpřístupní dutina břišní a levostranná pleurální dutina.

Transtorakální přístup umožňuje provést kompletní en-block disekci jícnu s adekvátní břišní a hrudní lymfadenektomií pod kontrolou zraku, zatímco při transhiatálním přístupu je možné odstranit kromě břišních pouze dolní mediastinální LU. Transtorakální ezofagektomie s hrudní anastomózou je tedy onkologicky radikálnější ve smyslu počtu odstraněných LU a má menší množství dehiscencí a striktur anastomózy (Mertens, Alexander C et al. 2021, Takahashi, Caitlin et al. 2021). Naproti tomu transhiatální přístup má menší výskyt plicních a srdečních komplikací, nižší morbiditu a mortalitu a kratší dobu hospitalizace (Wei, Ming-Tian et al. 2014).

Pouze jedna randomizovaná studie porovnávající dlouhodobé výsledky těchto přístupů neprokázala statistický rozdíl v celkovém přežívání, ale byl patrný trend lepšího dlouhodobého přežívání po 5 letech u transtorakálního přístupu (Hulscher, Jan B F et al. 2002, Omloo, Jikke M T et al. 2007). Standardizace chirurgického přístupu by tedy mohla být silnějším prognostickým faktorem než výběr konkrétního chirurgického přístupu (Markar, Sheraz R et al. 2015).

Metoda, jak dosáhnout lepší lymfadenektomie mediastina u transhiatálního přístupu, byla navržena v Japonsku a využívá mediastinoskopickou lymfadenektomii z krční incize. Zatím jsou publikovány malé soubory pacientů, ale je přínosná pro pacienty neúnosné ke dvoudutinové resekci (Fujiwara, H et al. 2017, Daiko, Hiroyuki et al. 2021).

V současné době je celosvětově užívanější transtorakální přístup, kterým je provedeno 80 % všech ezofagektomií (Low, Donald E et al. 2019). Transtorakální Ivor-Lewis ezofagektomie je preferovaným přístupem na pracovišti autora.

1.5.5.2 Lymfadenektomie

Součástí resekce jícnu je i odstranění spádových LU. Pro karcinom jícnu a GEJ jsou to uzliny abdominální (parakardální a u malé kurvatury, kolem tr. coeliacus, a. gastricasinistra, a. hepaticacommunis a proximálního úseku a. lienalis), mediastinální (paraesofageální a paratracheální) a případně LU kolem krčního úseku jícnu a kolem zvrtných nervů.

Rozsah lymfadenektomie při resekci jícnu pro karcinom je velice diskutované téma.

V západních zemích se zlatým standardem stala transtorakální ezofagektomie s lymfadenektomií dvou polí (tedy břišní a limitovaná mediastinální LU). Zatím nebyl stanoven konsenzus ohledně přínosnosti horní mediastinální, případně krční lymfadenektomie na dlouhodobé přežívání u pacientů s adeokarcinomem jícnu. V Asii a především Japonsku převažuje koncept lymfadenektomie tří polí (břišní, mediastinální, krční). Důvod rozdílných přístupů k lymfadenektomii lze vysvětlit rozdílným zastoupením a lokalizací obou histologických typů. V západních zemích je 85 % adenokarcinomů, a to převážně v distálním jícnu a GEJ. V Asii jde v 95 % o dlaždicobuněčný karcinom, který se vyskytuje převážně v proximálním a středním hrudním jícnu. Metaanalýza porovnávající lymfadenektomii dvou a tří polí na více než 7 000 pacientech s karcinomem jícnu konstatovala, že lymfadenektomie tří polí zlepšuje celkové přežívání, ale je zatížena vyšším počtem paréz zvrtných nervů a dehiscencí anastomózy (Ma, Guo-Wei et al. 2014).

Diskrepance také panuje ohledně minimálního počtu odstraněných LU. Dle AJCC je to 10 LU, dle holandských doporučených postupů 15 LU a dle německých S3 doporučených postupů je to 20 LU (Hagens, Eliza R C et al. 2017). Dle některých autorů by rozsah lymfadenektomie měl odpovídat T stadiu onemocnění. Rizk et al. doporučují 10 LU pro pT1, 20 LU pro pT2 a ≤30 LU pro pT3 stadium (Rizk, Nabil P et al. 2010).

V současné době probíhá mezinárodní studie TIGER, jejímž cílem je analyzovat vzorky 5 000 pacientů s karcinomem jícnu, kteří podstoupí transtorakální resekci s lymfadenektomií minimálně dvou polí. Primárním cílem je vytvořit „distribuční mapu“ pozitivních LU dle histologie, klinického stagingu, hloubky invaze a přesné lokalizace nádoru (Hagens, Eliza R C et al. 2019). Na podkladě jejích výsledků bude možno individualizovat léčbu, tedy například optimalizovat radiační pole nebo rozsah lymfadenektomie.

1.5.5.3 Miniinvazivní přístupy

Miniinvazivní přístupy v chirurgii, které se rozvíjely od 90. let 20. století, začaly být postupně implementovány i do chirurgie karcinomu jícnu. V roce 2012 byly publikovány výsledky studie TIME, která porovnávala otevřenou a miniinvazivní resekci jícnu (Biere, Surya S A Y et al. 2012). Oba přístupy byly srovnatelné v počtu R0 resekcí, odebraných LU a tříletém přežívání a miniinvazivní přístup poskytoval signifikantně méně plicních komplikací, menší krevní ztrátu, kratší hospitalizaci a lepší kvalitu života (Straatman, Jennifer et al. 2017). Od té doby se minimálně invazivní ezofagektomie těší celosvětově rostoucímu zájmu. MIRO studie z roku 2019 porovnávala otevřenou operaci s hybridní, kdy břišní fáze byla provedena laparoskopicky a hrudní z torakotomie. Hybridní přístup byl zatížen signifikantně nižším výskytem závažných perioperačních komplikací, hlavně plicních (Mariette, Christophe et al. 2019). Snížení celkových i plicních pooperačních komplikací po totální miniinvazivní ezofagektomii (TMIE) ve srovnání s hybridním přístupem prokazuje i další studie (Patel, Krashna et al. 2021). Metaanalýza studií srovnávajících TMIE s hybridními přístupy prokázala na souboru 1 492 pacientů obecně nižší morbiditu u TMIE, ale v subanalýze vyšší míru dehiscencí a méně odebraných LU (van Workum, Frans et al. 2020). To by mohlo být vysvětleno chirurgickou křivkou učení (learningcurve), která je pro TMIE delší (Claassen, Linda et al. 2019).

Zavedení robotické chirurgie přineslo větší flexibilitu nástrojů a lepší 3D obraz a zavedení robotické ezofagektomie byl další posun v operační technice. Randomizovaná studie ROBOT porovávající roboticky provedenou hrudní fázi a laparoskopicky provedenou břišní fázi s otevřenou operací prokázala u miniinvazivního přístupu méně pooperačních kardiopulmonálních komplikací a rychlejší rekonvalescenci (van der Sluis, Pieter C et al. 2019). Krátkodobé (R0 resekce, počet LU) i dlouhodobé (pětileté přežívání, míra recidiv)

onkologické výsledky byly shodné (de Groot, Eline M et al. 2020). Některé práce ukazují trend lepší lymfadenektomie u robotického přístupu oproti MIE (Tagkalos, E et al. 2020).

V současné době probíhá randomizovaná studie ROBOT-2, která porovná robotickou resekci jícnu s MIE (Tagkalos, E et al. 2021). Tyto povzbuzující výsledky vedly k plošnému zavádění miniinvazivních metod a například v Holandsku je dnes více než 90 % resekci jícnu prováděno miniinvazivně (<https://dica.nl/jaarrapportage-2019/duca>). Nevýhodou nových miniinvazivních metod je čas nutný k jejich ovládnutí a zdokonalení se, což má za následek vyšší počet komplikací při jejich zavádění. Bylo zjištěno, že 10 % pacientů (66/646) mělo dehiscenci anastomózy v rámci osvojování si miniinvazivních technik, kterým se mohlo předejít, pokud by byl pacient operován chirurgem erudovaným v této metodě (van Workum, Frans et al. 2019). Proto mnoho populačních studií nedokázalo potvrdit výhody miniinvazivních postupů prokázaných randomizovanými studiemi. Studie zkoumající implementaci miniinvazivní ezofagektomie porovnávala pacienty ze studie TIME s výsledky pacientů z národní databáze a konstatovala, že zavádění nové techniky na národní úrovni vedlo naopak k vyššímu počtu plicních komplikací, dehiscencí anastomóz a reoperací (Markar, Sheraz R et al. 2020). To naznačuje důležitost důsledného dozoru nad zaváděním nových technik (proctoring) a nutnost koncentrace těchto operací do specializovaných center.

1.5.5.4 Pooperační komplikace

Dvoudutinová resekce jícnu s lymfadenektomií představuje jeden z nejinvazivnějších onkochirurgických výkonů, který je zatížen nezanedbatelnou mírou pooperační morbidity a mortality, jež ale díky rozvoji operačních technik a perioperační intenzivní péče neustále klesají. Publikovaná míra morbidity má široké rozmezí, a to především kvůli v minulosti nestandardně nastaveným kritériím hodnocení jednotlivých komplikací. V roce 2011 vznikla skupina odborníků ECCG (European Complication Consensus Group), která navrhla standardizované definice zahrnující komplikace plicní, kardiální, gastrointestinální, urologické, tromboembolické, neurologicko-psychiatrické, infekční a komplikace vázané na operační ránu a bránici (Low, Donald E et al. 2015). V rámci tohoto registru se nadále zaznamenává závažnost komplikací podle Clavien-Dindo klasifikace (Dindo, Daniel et al. 2004). ECCG navíc udržuje databázi ESODATA, do které přispívá svými detailními daty o

resekci jícnu 24 vysokoobjemových center ze 14 zemí (Low, Donald E et al. 2019). Tato databáze je považována za důležité mezinárodní měřítko. Uvádí dosažení R0 radikality u 93,4 % operací a míru pooperační morbidity 59 %. Nejčastější pooperační komplikací je pneumonie a srdeční arytmie, obě s 15% výskytem. Dehiscence anastomózy byla pozorována u 12 % pacientů, chylothorax u 4,7 % a paréza zvratného nervu ve 4,2 % případů. Pooperační třicetidenní mortalita dosahuje 2,4 % a devadesátidenní 4,5 %. Pooperační komplikace nemají negativní vliv pouze na kvalitu života v pooperačním období, ale i na dlouhodobé přežívání. Metaanalýza 21 studií prokázala, že plicní komplikace a dehiscence anastomózy signifikantně snižují pětileté přežívání (Booka, E et al. 2018).

Snížení rizika pooperačních komplikací a mortality lze docílit správným selektováním pacientů při indikaci k operaci po zhodnocení výsledků funkčních předoperačních vyšetření a zhodnocení celkového stavu pacienta a jeho stavu nutrice. Analýza databáze ESODATA prokázala, že věk pacienta, jeho celkový stav a počet komorbidit zůstávají hlavními predikčními faktory pooperačního průběhu (D'Journo, XavierBenoit et al. 2021).

Retrospektivní analýzou 24 000 ezofagektomií z americké databáze NIS (Nationwide Inpatient sample) bylo zjištěno, že miniinvazivní operace včetně hybridní a operace ve vysokoobjemovém centru riziko mortality snižují, zatímco vyšší věk, komorbidity a histologie dlaždicobuněčného karcinomu mortalitu zvyšují (Fuchs, H F et al. 2017).

Vícečetnými studiemi bylo prokázáno, že resekce jícnu pro karcinom ve vysokoobjemovém centru zaručuje méně technických chyb při operaci, méně dehiscencí anastomózy, kratší pobyt na jednotce intenzivní péče a vyšší počet odebraných lymfatických uzlin (Voeten, Daan M et al. 2021) a snižuje pooperační mortalitu (Wouters, Michel W J M et al. 2012).

Švédská populační studie multivariační analýzou zjistila, že vyšší počet provedených operací chirurgem má větší protektivní vliv na mortalitu než počet operací v centru (Derogar, Maryam et al. 2013). V mnoha zemích došlo na podkladě těchto dat k centralizaci onkochirurgických operací jícnu do specializovaných center. Nicméně strategie jsou v jednotlivých státech rozdílné a centralizace silně závisí na interpretacích a předpisech specifických pro danou zemi. Regionální mezní hodnoty pro minimální počet ezofagektomií za rok se tedy značně pohybují od 7 operací v Kanadě po 80 v Dánsku. Počet operací na chirurga je definován pouze ve Spojeném království a USA (Vonlanthen, René et al. 2018).

Proto, jak poukázal D. Low ve své přelomové publikaci, specializované jednotky chirurgie horního zažívacího traktu se specifickým zájmem o vědecký výzkum svých výsledků jsou v

nejlepší pozici pro splnění budoucích požadavků centralizace chirurgie nádorů jícnu (Low, Donald E et al. 2019).

V rámci hledání cesty, jak snížit množství a závažnost pooperačních komplikací bylo vyzkoušeno několik inovativních postupů. Metoda operačního podvazu či endovaskulární embolizace (ischemic conditioning – IC) a. gastrica sinistra a případně krátkých gastrických cév způsobí relativní ischemii žaludku s redistribucí a zvýšením průtoku krve do ostatních cév zásobujících žaludek, především a. gastroepiploica dextra a případně může demarkovat linii prokrvení na žaludku, umožňující při resekční fázi zvolit vhodné místo k anastomóze. Výsledky této metody jsou nejednoznačné a v případě operačního podvazu se navíc tvoří srůsty komplikující následnou mobilizaci žaludku a lymfadenektomii (Berrisford, Richard G et al. 2009). Recentní metaanalýza prokázala, že metoda preischemizace žaludku nesnižuje výskyt anastomotického leaku, ale snižuje jeho závažnost (Kamarajah, Sivesh K et al. 2020).

Jinou metodou, jak snížit výskyt dehiscencí anastomózy, je použití endoluminální podtlakové terapie. Ta se dnes již standardně používá pro řešení dehiscencí a spočívá v endoskopickém zavedení polyuretanové houby napojené na podtlakový generátor do místa anastomózy, kde drénuje oblast dehiscence a odstraňuje zánětlivý exsudát a nekrotické hmoty. Úspěšnost zhojení anastomózy je 80-90 % (Berlth, Felix et al. 2019). Novým konceptem je zavedení podtlakové terapie již perioperačně k prevenci anastomotického leaku a k redukci s ní spojené morbidity. Zdá se, že je to slibná metoda především u rizikových polymorbidních pacientů (Müller, Philip C et al. 2021). V současné době probíhá randomizovaná studie, která má ověřit účinnost této metody (Müller, Philip C et al. 2021). Lokální ischemie tubulizovaného žaludku je častou příčinou špatného hojení anastomózy a vzniku dehiscence. Peroperační vizualizace hranice prokrvení použitím fluorescenční kamery a indocyaninové zeleně se ukázala jako slibná metoda redukce dehiscence anastomózy a nekrózy tubulizovaného žaludku (Slooter, Maxime D et al. 2019).

2. VLASTNÍ PRÁCE

2.1 Cíle práce

Cílem této práce bylo poskytnout podrobný přehled jak stávajících, tak především nových terapeutických přístupů v léčbě karcinomu jícnu. Současně jsme se svým výzkumem zaměřili na objasnění charakteristik nádorového mikroprostředí u pacientů s karcinomem jícnu, abychom přispěli k rozvoji moderních terapeutických protokolů u pacientů s touto malignitou. Zatímco chirurgická léčba zůstává nejdůležitější léčebnou modalitou v léčbě lokalizovaných maligních lézí, současné možnosti léčby metastatických karcinomů jícnu jsou velmi limitované. Imunoterapie prokázala slibné výsledky v klinických studiích, avšak požadované léčebné odpovědi bylo dosaženo jen u vybrané podskupiny pacientů. Trendem současné léčby metastatických nádorových onemocnění jsou takzvané checkpoint inhibitory. I tato léčba však nese svá specifika stran pacientů, kteří na léčbu odpovídají, a stran spektra nežádoucích účinků.

2.2 Cíle a přístupy postupně

2.2.1 Práce s názvem „The paratumoral immune cell signature reveals the potential for the implementation of immunotherapy in esophageal carcinoma patients“

V této studii se nám podařilo sestavit kohortu šestnácti pacientů, kteří byli operováni na našem pracovišti pro diagnózu karcinomu jícnu. Vytvořili jsme koncept studie, který umožňoval odběr nejen tkáně nádorové, ale též okolní peritumorózní tkáně, přilehlé tkáně zdravé a přilehlé lymfatické uzliny. Naší hypotézou bylo, že objasníme-li, jaké imunitní buňky se nacházejí v nádoru a přilehlých tkáňových kompartmentech, zjistíme, proč někteří pacienti neodpovídají na léčbu imunoterapií. S touto vizí bylo analyzováno celkem 62 tkáňových vzorků na pracovišti imunologie, a to prostřednictvím průtokové cytometrie, která umožňuje detailní analýzu povrchových molekul na imunitních buňkách. V rámci studie jsme sbírali též histopatologická data pacientů a stran klinických a anamnestických údajů byl pro nás nejdůležitější údaj, zda pacienti jsou kuřáci či zda měli před operací již neoadjuvantní chemoterapii či radioterapii. Získané výsledky jsme pak analyzovali, interpretovali a

publikovali v zahraničním recenzovaném časopise. Autor textu je v této práci prvním sdíleným autorem.

2.2.2 Práce s názvem „The TRAIL in the Treatment of Human Cancer: An Update on Clinical Trials“

V této práci jsme se zabývali molekulou s názvem TRAIL (Tumor-necrosis factor related apoptosis inducing ligand). Jedná se o molekulu proteinové povahy, u níž byla původně popsána schopnost selektivně spouštět apoptózu, tedy buněčnou smrt, pouze u nádorových buněk. Tento protein je produkován řadou imunitních buněk, ovšem lze jej též uměle připravit a užívat v léčbě nádorových onemocnění. My jsme v naší práci představili aktuální stav všech probíhajících klinických studií, které zpracovávají tematiku monoterapie a kombinované terapie TRAIL preparáty. Naším hlavním cílem bylo představit nejslibnější klinické studie fáze II a III, ale též poukázat na nové modifikace TRAIL terapie a deriváty této molekuly, které mají potenciál vstoupit v nejbližší době do klinických studií. Autor textu je v této publikaci prvním autorem.

2.2.3 Práce s názvem „Tumoral and paratumoral NK cells and CD8⁺ T cells of esophageal carcinoma patients express high levels of CD47“

V této studii jsme se zaměřili na novou potenciální léčebnou modalitu pro karcinom jícnu. Terapie prostřednictvím monoklonální protilátky proti CD47 je založená na bloádě takzvaného „don't eat me“ (CD47) signálu, který na svém povrchu nesou nádorové, ale i jiné buňky, aby se ochránily před fagocytózou způsobenou makrofágy. My jsme v této studii analyzovali 36 tkání od dvanácti pacientů s karcinomem jícnu a sledovali, zda nádorová či okolní tkáň u těchto pacientů má vysokou expresi molekuly CD47. Naší hypotézou bylo, že bude-li exprese CD47 vysoká, budou naši pacienti vhodnými kandidáty pro terapii monoklonální protilátkou proti CD47. V této publikaci je autor textu spoluautorem.

2.3 Výsledky a diskuze

Výsledky práce byly shrnuty do tří různých manuskriptů, které byly publikovány v mezinárodních vědeckých časopisech. Níže jsou diskutovány separátně výsledky každého z těchto manuskriptů tak, abychom nastínili význam naší dosavadní a též budoucí práce.

2.3.1 Práce s názvem „The paratumoral immune cell signature reveals the potential for the implementation of immunotherapy in esophageal carcinoma patients“

K dnešnímu dni nebyla vytvořena studie, která by jasně objasňovala roli tumor-infiltrujících imunitních buněk a buněk v okolní tkáni u pacientů s karcinomem jícnu. Z toho důvodu jsme se zaměřili na analýzu distribuce T buněk v nádorovém mikroprostředí karcinomu jícnu. Současně jsme v rámci této studie analyzovali receptory smrti ve vybraných tkáňových kompartmentech (nádor, peritumorozní tkáň, přilehlá zdravá tkáň a lymfatická uzlina), abychom predikovali, zda mají tyto imunitní buňky vysokou náchylnost k buněčné smrti. Od každého pacienta jsme též sbírali klinicko-patologická data a získané výsledky následně korelovali.

U všech pacientů jsme zjistili, že distribuce NK (natural killer) buněk, CD8 a CD4 pozitivních T buněk se liší v závislosti na analyzovaném tkáňovém kompartmentu. Zatímco v lymfatických uzlinách bylo nejvyšší zastoupení T buněk, u NK buněk tomu bylo právě naopak a jejich procentuální zastoupení v lymfatických uzlinách bylo nejnižší. Věděli jsme, že Fas receptor (FasR) je jeden z nejvýznamnějších receptorů smrti a jeho zvýšená přítomnost na buňkách značí vysokou náchylnost buněk ke smrti apoptózou. Sledovali jsme tedy kombinaci receptorů smrti FasR a DR3 (death receptor 3) na T buňkách a NK buňkách u pacientů s karcinomem jícnu. Zjistili jsme, že nejnižší zastoupení receptorů smrti bylo pozorováno na CD4 T buňkách v lymfatických uzlinách. Tento fakt jsme přisuzovali skutečnosti, že T buňky v lymfatické uzlině nejsou v aktivním boji s nádorovými buňkami, a nemají tedy důvod nadměrně umírat. Poté, co jsme se zaměřili na klinicko-patologické faktory, které by mohly ovlivňovat náchylnost buněk k buněčné smrti, s překvapením jsme zjistili, že faktor kuřáctví významně tento jev ovlivňuje. Naši kohortu jsme tedy rozdělili na kuřáky a nekuřáky, přičemž u všech kuřáků byly nacházeny nejen významně nižší počty peritumorozních T buněk a NK buněk, ale současně všechny tyto buňky vykazovaly velmi vysokou expresi receptorů smrti. Tento výsledek ukazuje, že aktivní kouření má kritický dopad na nádorové a okolní imunitní buňky a může významně ovlivnit prognózu pacientů s karcinomem jícnu a jejich schopnost

odpovědi na imunoterapii. Nejdůležitějším zjištěním naší studie bylo, že neoadjuvantní chemoterapie ovlivňuje imunitní infiltráty u pacientů s karcinomem jícnu. Zjistili jsme, že u pacientů s vysokým Mandard skóre, tedy u těch, kteří nereagovali na systémovou chemoterapii regresí nádorové hmoty, došlo ke změně poměru CD4 a CD8 buněk ve prospěch CD8 T buněk a tato změna může vést k zásadní senzitivizaci nádorového mikroprostředí k účinkům imunoterapie checkpoint inhibitory.

The paratumoral immune cell signature reveals the potential for the implementation of immunotherapy in esophageal carcinoma patients

Zuzana Strizova¹ · Martin Snajdauf² · Dmitry Stakheev¹ · Pavla Taborska¹ · Jiri Vachtenheim Jr² · Jan Biskup³ · Robert Lischke² · Jirina Bartunkova¹ · Daniel Smrz¹

Received: 25 January 2020 / Accepted: 12 May 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Purpose Esophageal cancer (EC) is one of the most lethal gastrointestinal malignancies. Immunotherapy is a promising treatment modality for this disease. However, broader implementation of EC immunotherapy has been discouraged because of insufficient understanding of tumor interactions with the immune system. As with other malignancies, the current research on EC focuses on deciphering the immune cell signatures within the tumor microenvironment. However, the disease-elicited immune cell profiles in the paratumoral compartments are largely unknown.

Methods We examined the immune cell signatures in 62 tissue samples from 16 EC patients in different esophageal tissue compartments: tumor tissue, peritumoral tissue, healthy esophageal tissue, and adjacent lymph nodes. We analyzed the proportions and distribution patterns of NK cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells as well as their death receptor (FasR, FasR/DR3)-expressing subpopulations. The analyzed data were then compared and correlated with the patients' clinicopathological data.

Results We found that the FasR⁺ NK cells, CD4⁺ and CD8⁺ T cells infiltrated lymph nodes at the lowest levels and that the FasR⁺DR3⁺ CD4⁺ T cells were enhanced in tumors. The comparisons with the clinicopathological data revealed a major impact of active smoking on the reduction in paratumoral NK cells and the upregulation of FasR in tumor-infiltrating NK and CD8⁺ T cells. The lymph node metastatic stage, tumor stage, and Mandard grade correlated with the compartmental proportions of the evaluated immune cells.

Conclusion The novel association of the disease state with tumoral and paratumoral immune cell signatures suggests new possibilities for personalized immunotherapy for EC patients.

Keywords Esophageal cancer · Tumor-infiltrating lymphocytes · Peritumoral lymphocytes · Fas receptor · Death receptor 3 · Mandard tumor regression grade

Zuzana Strizova and Martin Snajdauf are co-first authors.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00432-020-03258-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Daniel Smrz
daniel.smrz@lfmotol.cuni.cz

¹ Department of Immunology, Second Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, V Uvalu 84, Praha 5, 150 06 Prague, Czech Republic

² Third Department of Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

³ Department of Radiology, Second Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

Introduction

Esophageal cancer (EC) remains one of the most lethal gastrointestinal malignancies, with a 5-year survival rate of 41% for localized, 23% for regional, and only 5% for those with metastatic stage disease (Short et al. 2017). EC consists of two major histological subtypes: squamous cell carcinoma and esophageal adenocarcinoma (Moch et al. 2016; Napier et al. 2014). Both subtypes differ in incidence, etiology, and clinical features (Moch et al. 2016; Napier et al. 2014). The factors involved in the development and progression of EC have been extensively studied (Moch et al. 2016; Napier et al. 2014). However, the immune background of the disease is still poorly understood. This poor understanding

thus hampers the efficient treatment of the disease by immunotherapy.

Cancer immunotherapy has become one of the leading therapeutic modalities in metastatic diseases (Zhang and Chen 2018). For many patients, immunotherapy can lead to complete remission (Koury et al. 2018). However, in a number of patients, it largely fails (Koury et al. 2018). One of the mechanisms that prevents the immune system from efficient tumor eradication is the regulation of tumor infiltration with immune cells. Therefore, tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) have broad prognostic value and serve as prognostic biomarkers in many cancers (Badalamenti et al. 2019). In EC patients, a high load of TILs (greater than 50%) was associated with a significantly better cancer-specific survival rate than that of patients with a low proportion of TILs (Sudo et al. 2017). A multivariate analysis revealed that a high TIL proportion serves as an independent prognostic factor for EC-specific survival (Zheng et al. 2018). Detailed population analyses of TILs in EC patients showed that the number of CD8⁺ TILs positively correlated with improved overall survival (OS) and prolonged disease-free survival (Badalamenti et al. 2019). Better OS was also associated with increased numbers of CD4⁺ or natural killer (NK) TILs (Chen et al. 2017; Wang et al. 2017a).

In addition to the prognostic value of TILs, the TIL phenotype may also predict whether they can effectively challenge tumor cells or whether they will remain inactive or die by induced apoptosis (Strizova et al. 2019; Zhu et al. 2017). Recent findings suggest that the Fas ligand–Fas receptor (FasL–FasR) signaling axis is responsible for the induction of apoptosis in tumor-infiltrating cytotoxic T cells, leading to an overall reduction in TIL numbers (Zhu et al. 2017). Moreover, FasL-induced apoptosis of TILs has been described as a major factor contributing to immunotherapy failure (Zhu et al. 2017). FasL and other death receptor ligands, such as TL1A, a ligand for death receptor 3 (DR3) (Ge et al. 2011), are often highly expressed by tumor cells and can trigger apoptosis of TILs that express death receptors (Zhu et al. 2019). In EC, it has been already shown that tumor cells can counterattack TILs via highly expressed FasL (O’Connell 2002). Similar findings were observed in other malignancies, e.g., gastric cancer, breast cancer, and others (Peter et al. 2015).

Despite the fact that TILs and their phenotypic patterns may provide wide prognostic value for many cancers, they fail to indicate the actual mechanisms by which tumor cells evade elimination by immune cells. To better understand the mechanisms that drive tumor resistance, it is necessary to also determine the paratumoral distribution and phenotypic patterns of infiltrating immune cells. Recent studies have similarly shown that the spatial distribution and proportions of different subsets of infiltrating lymphocytes in the tumoral

and paratumoral compartments have clinicopathological significance and may provide insight into the mechanisms that drive the tumor resistance (Fridman et al. 2011; Giraldo et al. 2015; Miksch et al. 2019; Park and Kim 2017; Sorbye et al. 2012; Strizova et al. 2019). The prognostic and clinicopathological relevance were often attributed to CD8⁺ and CD4⁺ T cells (Miksch et al. 2019; Sorbye et al. 2012), their ratio (Behr et al. 2014; Wang et al. 2017a, b), NK cells (Lee et al. 2019), or both cell types (Strizova et al. 2019; Zancoppe et al. 2010). In EC, studies that would evaluate spatial distribution and proportions of different subsets of infiltrating lymphocytes across the disease-affected and adjacent healthy esophageal tissue remain to be conducted.

The purpose of this study was to determine whether the distribution of infiltrating immune cells and the expression of selected death receptors on these cells in four tissue compartments from EC patients correlate with patient’s clinicopathological data and whether these findings might elucidate the mechanisms of tumor progression and immune resistance. Hence, we examined the tissue distribution of NK cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells as well as their FasR- and FasR/DR3-expressing subpopulations in tumor tissue, peritumoral tissue, healthy esophageal tissue, and adjacent lymph nodes with respect to the clinicopathological data of the patients.

Materials and methods

Patients and specimens

We evaluated 62 tissue samples from 16 EC patients who underwent surgery between September 2018 and June 2019 at the Third Department of Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol in Prague. The age range of subjects was 46–75 years (mean: 65 years). Each patient’s demographic and clinical information was obtained from the medical records data in the central database of the University Hospital Motol in Prague. The patients’ information and the tissue samples were acquired with approval from the Ethics Committee of the University Hospital Motol in Prague (EK-810/18), and all patients signed informed consent agreements before participating in the study.

Cell isolation

The tissue samples from tumors, peritumoral tissues, adjacent healthy esophageal tissues, and the lymph nodes, were resected from each patient during a surgical procedure. Tissue samples were processed as described previously

(Strizova et al. 2019), and the isolated cells were analyzed by flow cytometry or cryopreserved for later analysis.

Flow cytometry

The isolated cells were stained with fluorophore-conjugated protein-specific antibodies in cold PBS/EDTA and incubated for 30 min in the dark. The following antibodies were used: CD45 A700 (prod.# A7-222-T100, Exbio, Prague, Czech Republic), CD56 FITC (prod.# 1F-231-T100, Exbio), CD3 PerCP-Cy5.5 (prod.# 45-0036-42, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), CD4 PeyCy7 (prod.# 25-0049-42, eBioscience, San Diego, CA), CD8 PeDy 594 (prod.# T5-207-T100, Exbio), CD95 APC (prod.# 305611, BioLegend, San Diego, CA), DR3 PE (prod.# ADXB0115071, R&D Systems, Minneapolis, USA), PD-1 APC (prod.# 329908, BioLegend). The isolated cells were further analyzed by a FACS Aria II flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), and the obtained data were evaluated and visualized by FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Statistical analysis

The means and SEM values were calculated from the indicated sample size (n) using GraphPad Prism 6 (GraphPad software, La Jolla, CA). Statistical significance ($P < 0.05$) was determined by the indicated test.

Results

The distributions of NK cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells differed in the tumor tissue, peritumoral tissue, healthy esophageal tissue, and adjacent lymph nodes

In this study, we evaluated 62 tissue samples from 16 EC patients whose esophageal tumor had been surgically resected (Table 1). The surgery provided tissue samples from the tumor tissue, peritumoral tissue, healthy esophageal tissue, and adjacent lymph nodes (Fig. 1a). All four tissue samples were obtained from 14 patients. For two patients, the adjacent lymph node was not available. The infiltrating lymphocytes were isolated from freshly resected tissues, stained with the indicated antibodies, and evaluated by flow cytometry. The obtained flow cytometry data were then analyzed as indicated in Fig. 1b. The analyzed data were then correlated with the clinicopathological data of the patients (Fig. 1a).

Table 1 Demographic data of patients and their tumors

Characteristic	Patients (n)	Patients (%)
Age		
> 70	4	25
70–60	10	62.5
< 60	2	12.5
Sex		
Male	12	75
Female	4	25
Histology		
Adenocarcinoma	13	81.25
Squamous cell carcinoma	3	18.75
Smoking history		
Active smoker	6	37.5
Ex-smoker	7	43.75
Nonsmoker	2	18.75
Tumor grade		
1	0	0
2	3	18.75
3	9	56.25
4	0	0
Not classified	4	25
TNM tumor stage		
T1a	0	0
T1b	2	12.5
T2	1	6.25
T3	12	75
T4a	1	6.25
TNM lymph node metastatic stage		
N0	7	43.75
N1	3	18.75
N2	4	18.75
N3	2	12.5
Mandard regression grade (TRG)		
1	0	0
2	3	18.75
3	3	18.75
4	4	25
5	2	12.5
Not classified	4	25
Chemotherapy		
Yes	12	75
No	4	25
Radiotherapy		
Yes	2	12.5
No	14	87.5

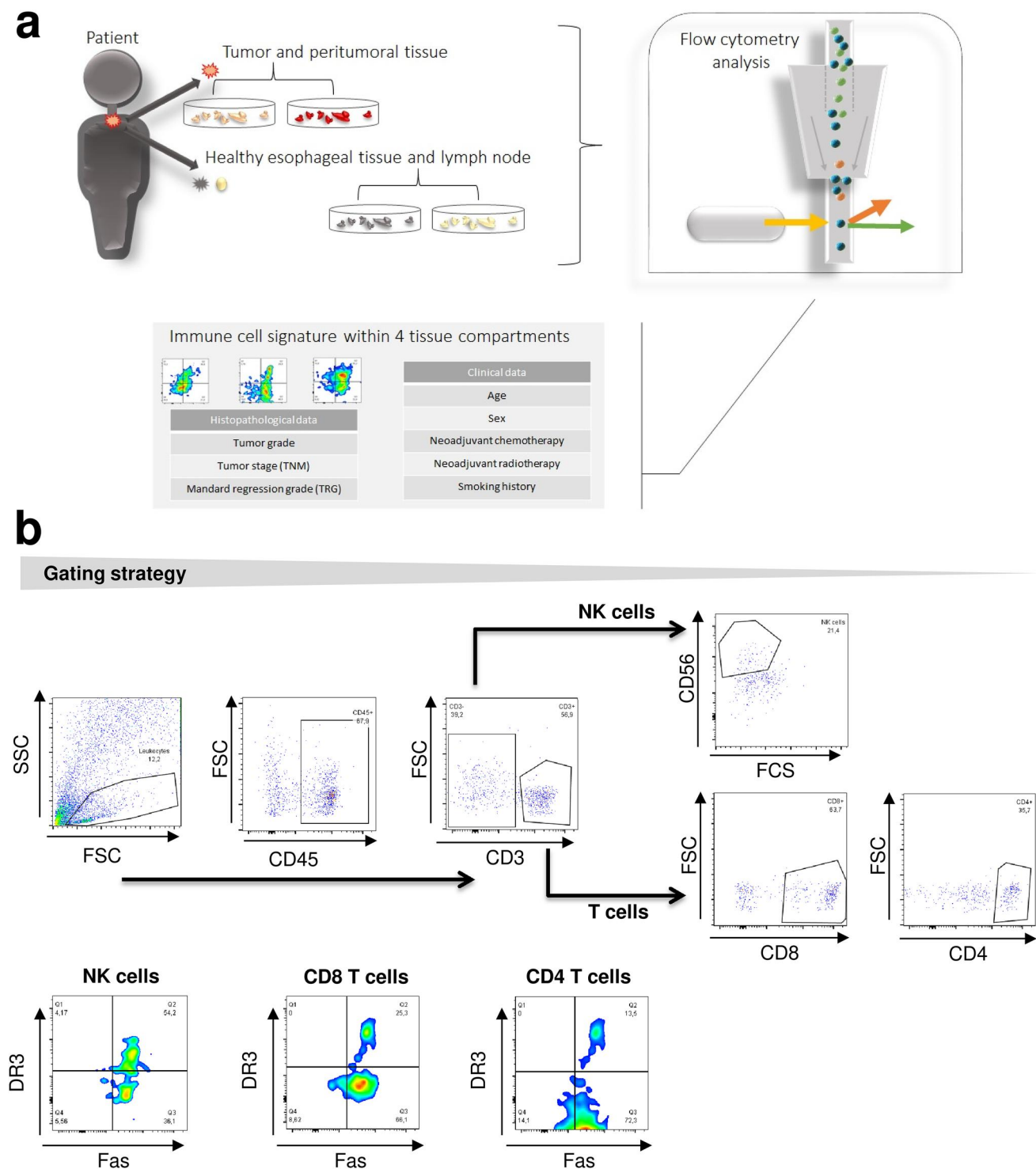


Fig. 1 Experimental workflow and the gating strategy. **a** Tissue samples were obtained from patients after surgical resection of esophageal tumors. The surgery provided samples of tumor tissue, peritumoral tissue, healthy esophageal tissue, and adjacent lymph nodes.

Infiltrating lymphocytes were isolated from the tissue samples and analyzed by flow cytometry. The data were correlated with clinico-pathological data. **b** The gating strategy was used to analyze flow cytometry data

We first investigated the proportions of NK cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the four tissue compartments: the tumor tissue, peritumoral tissue, healthy esophageal tissue, and adjacent lymph nodes. The analyzed data showed that the proportion of infiltrating NK cells in the lymph nodes was significantly lower than that in the other three tissue compartments (Fig. 2a, top left). The opposite was observed for the T cells (Fig. 2a, top right). However, the proportion of CD8⁺ T cells in the compartments examined was similar to that of NK cells, with the lowest proportions in the adjacent lymph nodes (Fig. 2a, bottom left). On the other hand, the proportion of CD4⁺ T cells followed a similar pattern of tissue distribution as that of all T cells, with the highest proportions in the adjacent lymph nodes (Fig. 2a, bottom right). These data showed significant differences in the compartmental distribution of NK cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells.

FasR⁺ NK cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells showed the lowest infiltration into lymph nodes among the evaluated tissue compartments

In the next series of experiments, we investigated whether the phenotype of the analyzed lymphocyte populations was differentially distributed within the tested compartments. The expression of the inhibitory molecule PD-1 has been shown to be affected by the spatial localization of infiltrating lymphocytes within the tumoral and paratumoral compartments (Tamura et al. 2018). PD-1 was also found to be expressed on TILs of EC patients (Xie et al. 2016). Although we confirmed PD-1 expression in the infiltrating lymphocytes of EC patients, we found no apparent differences in the distribution of PD-1⁺ populations of NK cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells within the tested compartments (Fig. S1a). We, therefore, next focused on the expression pattern of FasR and DR3. The expression of FasR or its coexpression with DR3 on immune cells may indicate higher susceptibility to ligand-induced apoptosis (Kumar et al. 2005; Park et al. 2012). Therefore, we evaluated the distribution of FasR-expressing NK cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the four tested tissue compartments. We found that the proportion of FasR-expressing NK cells was significantly lower in the adjacent lymph nodes than in the other 3 tissue compartments (Fig. 2b, left panel). A similar pattern was observed for the CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Fig. 2b, middle and right panels).

FasR⁺DR3⁺ CD4⁺ T cell levels were enhanced in tumor tissue

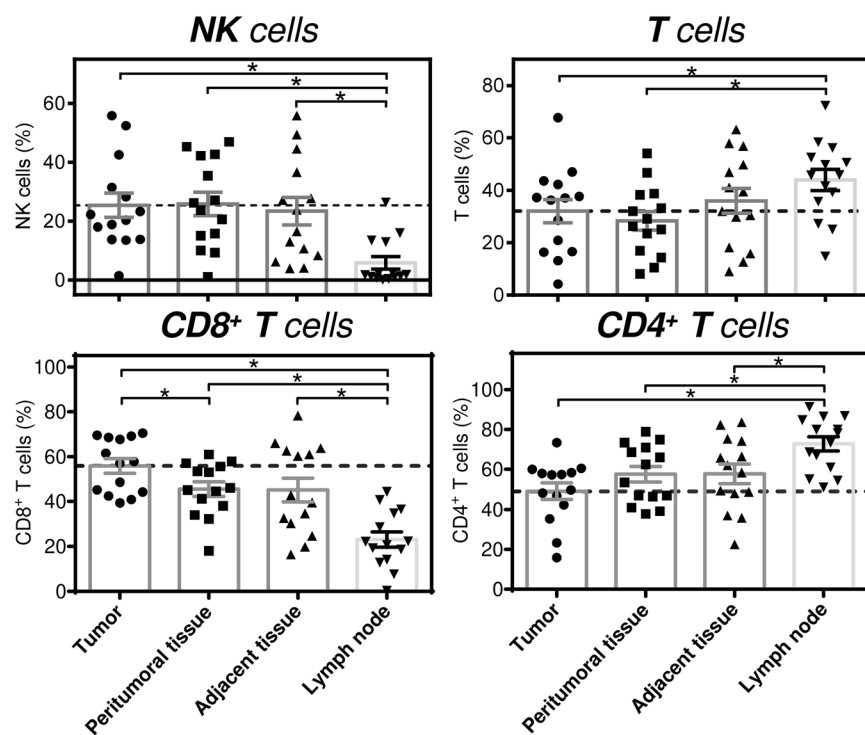
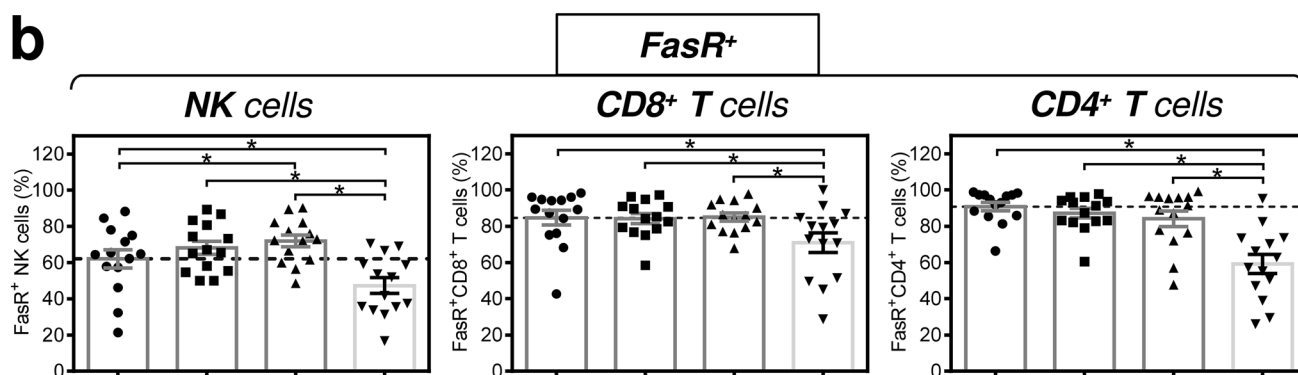
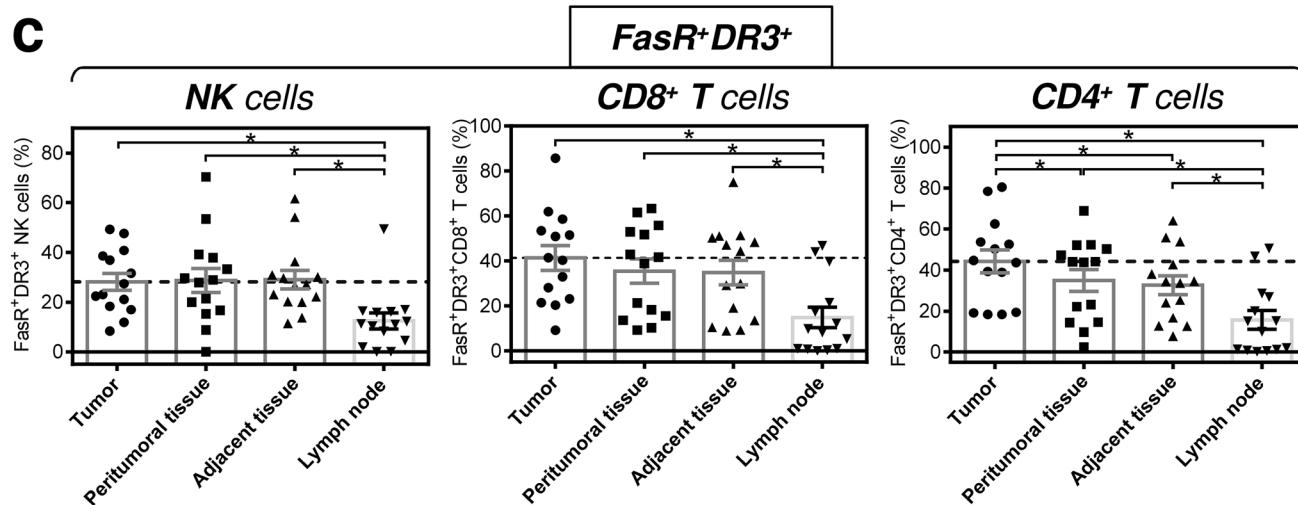
Our initial data indicated that in the tumor tissue, DR3 was predominantly expressed on FasR-expressing NK

cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Fig. S1b). The predominant expression of DR3 on the FasR-expressing cells was evident for all three cell types (Fig. S1b) and in all the evaluated compartments (data not shown). Further analyses revealed that the proportions of the FasR⁺DR3⁺ cell subpopulations among the evaluated cells were significantly decreased in the lymph nodes (Fig. 2c), suggesting that the cell subpopulations residing in the lymph nodes were less exposed to the ligands that induce apoptosis. Additionally, whereas the FasR⁺DR3⁺ NK and CD8⁺ T cells were found in comparable proportions in the tumor, peritumoral, and healthy esophageal tissues (Fig. 2c, left and middle panels), the proportion of FasR⁺DR3⁺ CD4⁺ T cells was significantly elevated in the tumor tissue (Fig. 2c, right panel).

The NK cell levels were decreased in the peritumoral and healthy esophageal tissues of active smokers

The findings in the first part of the study indicated that the analyses of the tissue immune cell signature that included the nontumor tissue might offer an expanded view of the interactions of immune cells with tumors and their manifestation in disease behavior. Therefore, we compared and correlated the available patients' clinicopathological data (Table 1) with the proportions of select phenotypes observed in the three EC tissue compartments: the tumor tissue, peritumor tissue, and healthy esophageal tissue.

Among several globally established risk factors for EC development, smoking history was the only risk factor that could be easily and reliably reported. In the cohort of 16 patients, one patient was excluded because his/her smoking history could not be obtained. Of the 15 remaining patients, three patients were nonsmokers; 12 patients had a history of smoking, of whom six remained active smokers during the therapy; and six were ex-smokers at the time of the surgery. We first stratified the patients into a group of six active smokers and a group of nine non-/ex-smokers. We then compared these two groups in terms of the proportions of NK cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the three EC tissue compartments. As shown in Fig. 3a (right and middle panels), the CD4⁺ and CD8⁺ T cells and the CD4⁺:CD8⁺ T cell ratio in these tissue compartments were not significantly different between the groups of active smokers (Smoker) and non-/ex-smokers (Nonsmoker). However, a significant increase in NK cells in the peritumoral and healthy esophageal tissues was found in the non-/ex-smoker group (Fig. 3a, second and third panels from the top on the left). Similar results were obtained when the patients were stratified into a group of 6 active smokers and a group of seven ex-smokers (data not shown). These data showed

a**b****c**

◀**Fig. 2** Proportion of each type of immune cell in the tumoral and paratumoral compartments. **a** The proportions of NK cells (CD3⁻CD56⁺), T cells (CD3⁺), and CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the tumor tissues, peritumoral tissues, adjacent healthy esophageal tissues, and adjacent lymph nodes. **b** and **c** The proportion of the FasR-expressing (FasR⁺) (**b**) or FasR/DR3-expressing (FasR⁺DR3⁺) (**c**) populations among the immune cells in (**a**). In **a** and **b**, the significance of differences was determined by the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test ($n=14$). * $P<0.05$ was considered significant. The data are shown as the mean $\pm$ SEM

that active smoking was reflected in the paratumoral tissue immune cell signature.

FasR⁺ NK cell levels were increased in the tumors of active smokers

Cigarette smoking has previously been shown to affect the expression of FasR in CD4⁺ T cells in peripheral blood lymphocytes (Bijl et al. 2001). Hence, in the stratified groups of active smokers and non-/ex-smokers, we next analyzed the proportions of the FasR- and FasR/DR3-expressing subpopulations among the evaluated immune cells from the three EC compartments. We found no significant differences in the FasR/DR3-expressing subpopulations between the groups (Fig. S1c). However, differences were found in the FasR-expressing subpopulations of NK and CD8⁺ T cells in tumor tissues between the two groups (Fig. 3b, top left and middle panels). The levels of both the FasR⁺ NK cells and FasR⁺ CD8⁺ T cells were increased in the active smoker group. However, for FasR⁺ CD8⁺ T cells, the absolute difference was negligible (Fig. 3b, top middle panel); for FasR⁺ NK cells, the difference was profound (Fig. 3b, top left panel). Similar results were also obtained when the patients were stratified into a group of 6 active smokers and a group of seven ex-smokers (data not shown). Again, these data showed that the patients' lifestyle, such as active smoking, had an impact on the critical tumoral and paratumoral phenotypes of the EC tissue-infiltrating lymphocytes.

CD8⁺ T cell levels in tumors increased with the severity of lymph node affection with metastases

The biological behavior of a tumor is reflected not only by its size and grade but also by its ability to spread to regional lymph nodes. TNM staging of EC distinguishes four stages of lymph node affection: N0, no regional lymph node metastasis; N1, with metastases in 1–2 regional lymph nodes; N2, metastases in 3–6 regional lymph nodes; and N3, with

metastases in 7 or more regional lymph nodes (Rice et al. 2017).

In our cohort of 16 patients (Table 1), the extent of lymph node affection ranged from N0 to N3. No metastases were detected in seven patients, 1–2 metastases in three patients, 3–6 metastases in four patients, and 7 or more metastases in two patients. Because the immune system is the key player in restraining the tumor to its original location and in preventing its dissemination (Janssen et al. 2017), the tissue immune cell signature might correlate with lymph node metastatic stage. Our data indeed revealed that the proportion of CD8⁺ T cells increased with the severity of lymph node metastasis (Fig. 4a, second left top panel). This increase correlated with a skewed CD4⁺:CD8⁺ T cell ratio in this compartment (Fig. 4a, top right panel). No such changes were observed in the other two studied compartments (Fig. 4a, middle and bottom panels).

FasR⁺DR3⁺ NK cell levels in the peritumoral tissue increased with the severity of lymph node metastasis

We next investigated whether any correlations between lymph node metastatic stage and the death receptor-expressing subpopulations in the evaluated immune cells could also be found. We initially found no correlation between the FasR-expressing subpopulations in the immune cells (Fig. S2a) or between the FasR/DR3-expressing CD4⁺ and CD8⁺ T cells in all the three evaluated compartments (Fig. 4b, middle and right panels). However, the number of regional lymph node metastases correlated with the proportion of FasR⁺DR3⁺ NK cells in the peritumoral compartment (Fig. 4b, middle left panel). These data showed that the metastatic behavior of EC is reflected in both tumoral and paratumoral immune cell infiltration and may affect critical phenotypic immune patterns.

CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the peritumoral and healthy esophageal tissues were associated with tumor stage

In the next array of analyses, we investigated whether the tissue immune landscape in the EC compartments was associated with tumor stage. In the cohort of 16 patients, the stages were recorded as follows: stage one—two patients, stage two—one patient, stage three—12 patients, and stage four—one patient. As shown in Fig. 5b (top panels), no correlation between the analyzed cell proportion and tumor stage was found. No correlation between the proportions of NK cells in the peritumoral and healthy esophageal tissue

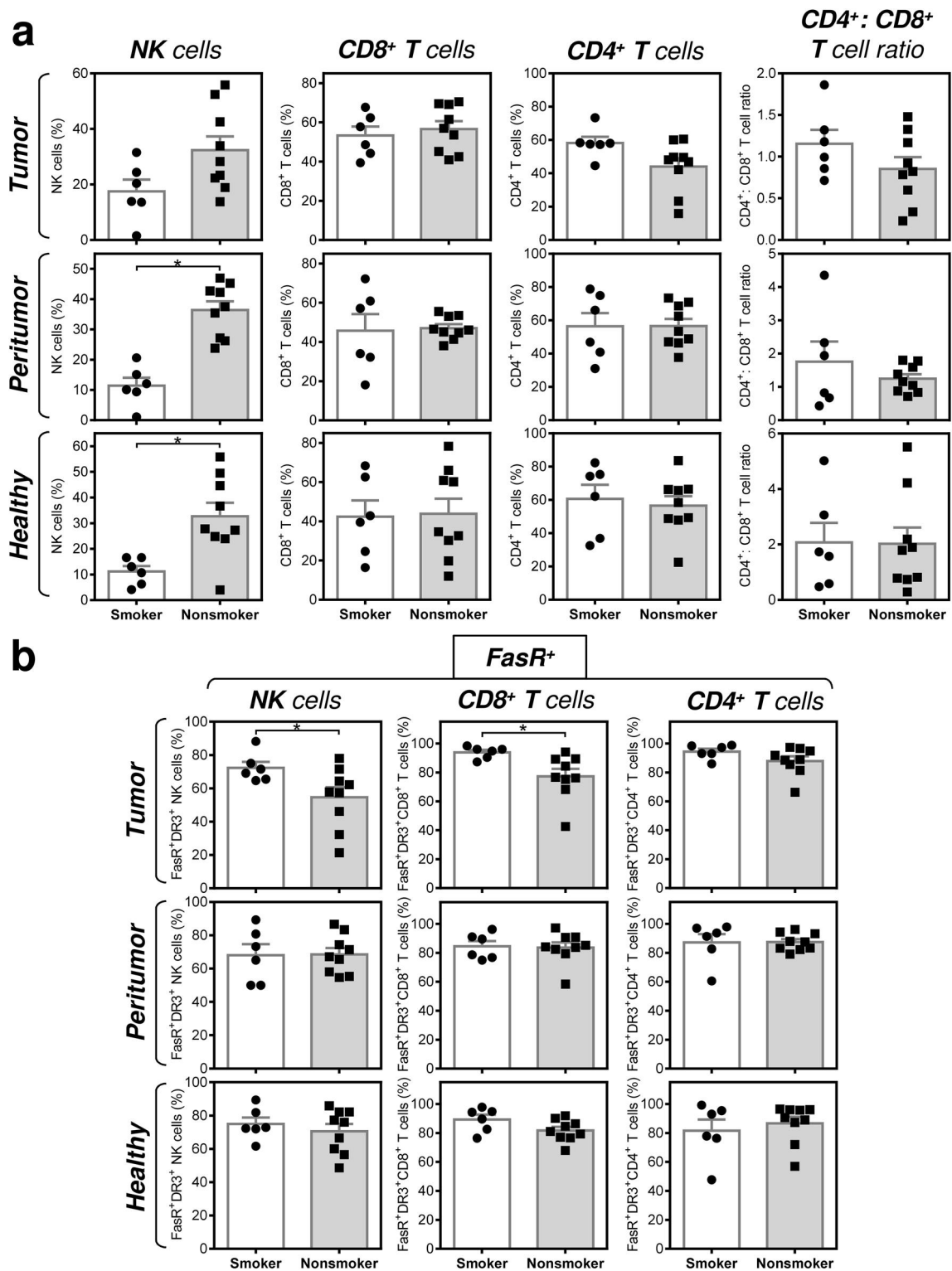


Fig. 3 Association of active smoking with immune cells in the tumoral and paratumoral compartments. **a** The proportions of NK cells (CD3⁺CD56⁺) and CD4⁺ and CD8⁺ T cell (CD3⁺) populations in 3 EC compartments in patients stratified into a group of 6 active smokers (Smoker) and a group of 9 non-/ex-smokers (Nonsmoker). **b** The proportions of the FasR-expressing (FasR⁺) or FasR/

DR3-expressing (FasR⁺DR3⁺) populations of immune cells in **a**. In **a** and **b**, the difference between the stratified groups of patients was evaluated by the Mann–Whitney test (Smoker, $n=6$; Nonsmoker, $n=9$). $*P<0.05$ was considered significant. The data are shown as the mean $\pm$ SEM

was found (Fig. 5a, left panels). However, in the healthy esophageal tissue, the proportion of CD4⁺ T cells was significantly decreased and the proportion of CD8⁺ T cells was increased with increased tumor stage (Fig. 5a, second and third bottom panels from the left). The CD4⁺ T cell:CD8⁺ T cell ratio was also significantly skewed in this compartment (Fig. 5a, right bottom panel). In the peritumoral compartment, the CD4⁺ T cell:CD8⁺ T cell ratio was also significantly different, but only the proportion of CD8⁺ T cells significantly increased with increasing tumor stage (Fig. 5a, second left panel in the middle). No correlations between the expression of FasR and FasR/DR3 on NK cells or CD4⁺ or CD8⁺ T cells in the EC compartments were found (Figs. S2b and S3a). These data show that tumor stage of the patients may be reflected in the paratumoral tissue immune cell signature.

Mandard tumor regression grade was inversely correlated with the CD4⁺ T cell:CD8⁺ T cell ratio of infiltrating T cells in the peritumoral and adjacent tissue compartments

We next investigated whether neoadjuvant therapy prior to surgery impacted the tissue immune cell signature. In the cohort of 16 patients in this study, 12 patients underwent neoadjuvant chemotherapy, and four patients did not. For this small group of patients who did not receive neoadjuvant chemotherapy ($n = 4$), we found no significant impact of neoadjuvant therapy on the proportions of NK cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells and their death receptor-expressing subpopulation in any of the evaluated compartments (Figs. S3b and S4). However, the data in the figures indicate that statistical significance was not achieved partially because of a noticeable spread of the obtained values for the group of patients who had received therapy (Figs. S3b and S4). This observation suggests that the neoadjuvant chemotherapy itself might have elicited this variation in the individual responses of patients to the therapy. In the next analyses, we stratified the patients in the treatment group according to their responses to the therapy.

Mandard tumor regression grading (TRG) is one of the major factors that refers to a patient's outcome after neoadjuvant chemotherapy (Thies and Langer 2013). This scoring system reflects the extent of regressive changes after cytotoxic treatment, and with decreasing Mandard TRG, the response to chemotherapy is considered histopathologically improved (Thies and Langer 2013). For the analysis, the data from 12 patients were available: three patients had a TRG 2 score (rare residual cancer cells), three patients had a TRG 3 score (fibrosis outgrowing residual cancer),

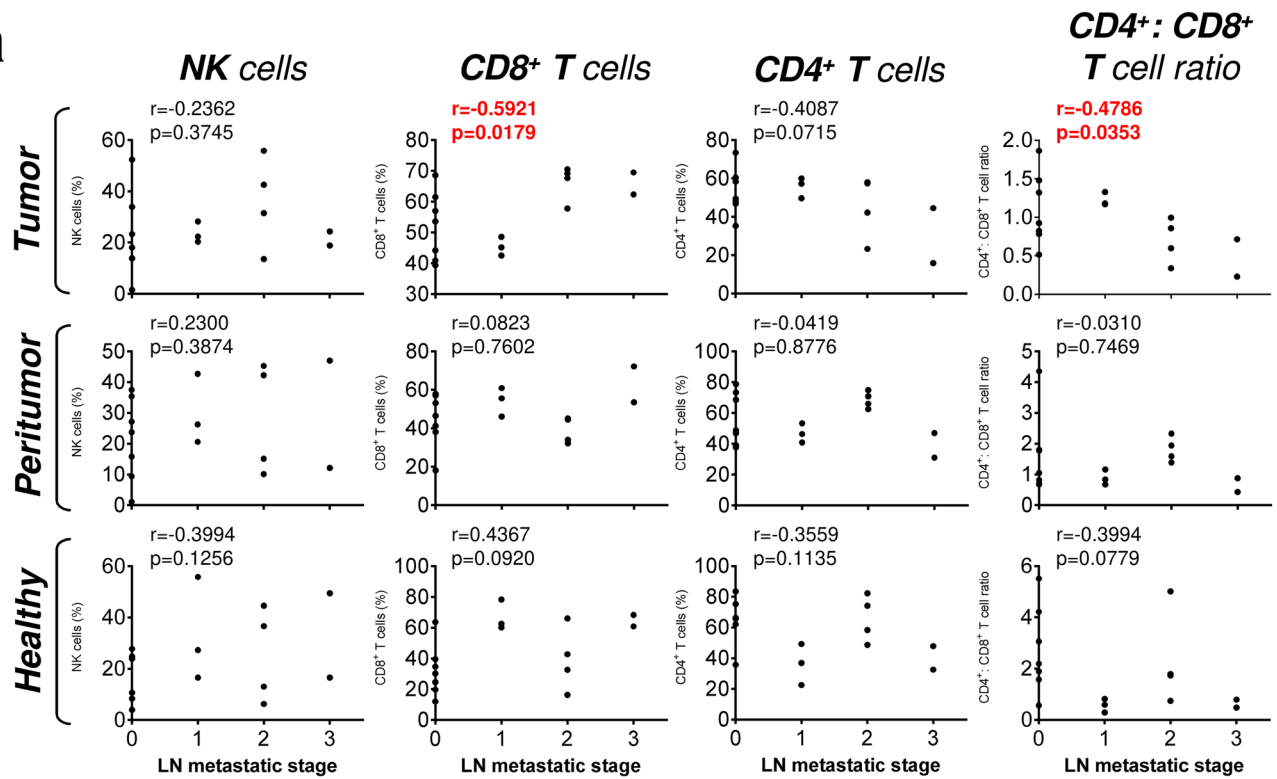
four patients had a TRG 4 score (residual cancer outgrowing fibrosis), and two patients had a TRG 5 score (absence of regressive changes). The results of the analysis showed that the Mandard TRG did not correlate with the proportions of FasR- or FasR/DR3-expressing subpopulations of NK cells or CD4⁺ or CD8⁺ T cells in any of the three EC tissue compartments (Fig. S5). No correlations with TRG score were found for the proportions of NK cells or CD4⁺ or CD8⁺ T cells in the tumor tissues (Fig. 5b, top panels) or for the proportion of NK cells in the peritumoral or healthy esophageal tissues (Fig. 5b, left middle and bottom panels). However, the proportion of CD8⁺ T cells in the peritumoral tissue was significantly increased with increased TRG score (Fig. 5b, middle second and third panel from left). This increase skewed the CD4⁺ T cell:CD8⁺ T cell ratio in this tissue compartment. This ratio was significantly decreased with increasing TRG score (Fig. 5b, middle right panel). In the healthy esophageal tissue, both the CD4⁺ T cell:CD8⁺ T cell ratio and the CD4⁺ and CD8⁺ T cell proportions were significantly correlated with the Mandard TRG score (Fig. 5b, second, third and fourth bottom panel from the left). These results showed that some of the major clinicopathological data that did not relate to the immune cell signatures in the tumor related to the immune cell signatures in the tissue compartments associated with the tumor.

Discussion

In the current era of exploding immunotherapy, there is a demand to explore TILs to determine their mechanisms of cancer resistance to immunotherapy (Sharma et al. 2017; Zhu et al. 2017). Despite the current analyses in which TILs are subjected to increasingly extensive profiling (Steele et al. 2018), it seems that the information that could be extracted from these cells has reached a limit (Hendry et al. 2017). Several studies, however, have recently showed that immune signatures of tissues associated with the tumor may overcome these limits by providing a much larger picture of the immune system context and of the disease itself (Fridman et al. 2011; Giraldo et al. 2015; Strizova et al. 2019).

The novel contexts thus discovered may influence disease prognosis and therapeutic algorithms (Fridman et al. 2017), particularly affecting the relationship between immune cell profiles of the tumor and the administration of systemic chemotherapy (Emens and Middleton 2015). For some malignancies, physicians are unable to reach a consensus on whether to apply chemotherapy prior to or after immunotherapy (Emens and Middleton 2015). It has

a



b

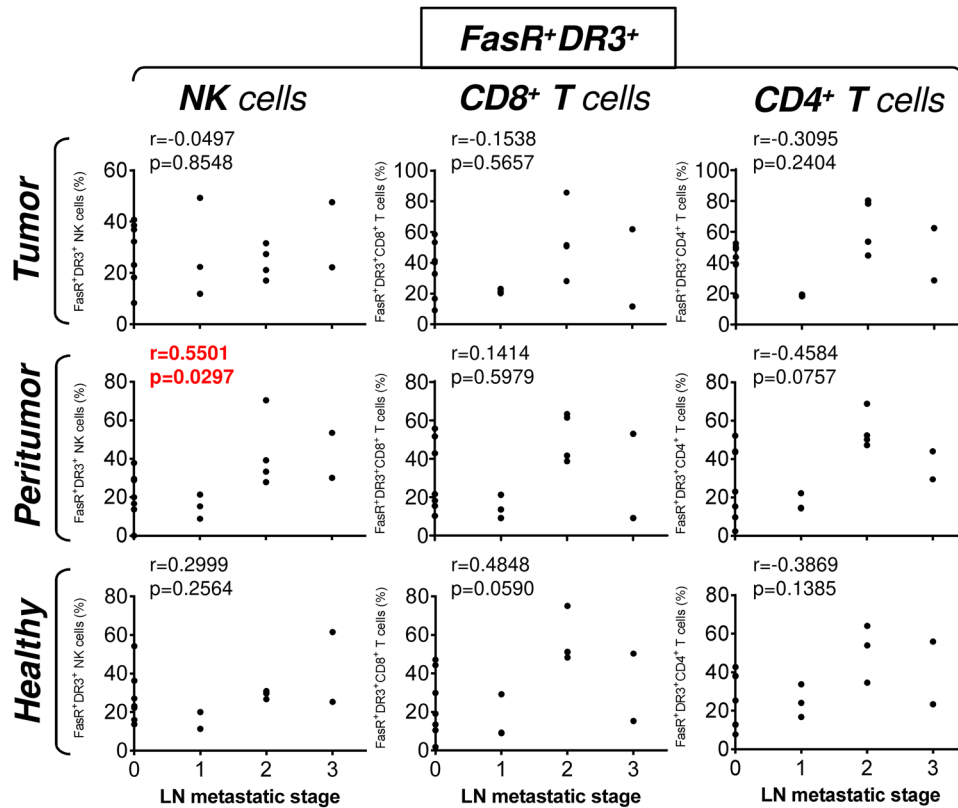


Fig. 4 Association of lymph node metastatic stage score with immune cells in the tumoral and paratumoral compartments. **a** Correlations of the proportions of NK cells (CD3⁺CD56⁺) and CD4⁺ and CD8⁺ T cell (CD3⁺) populations in 3 EC compartments with the lymph node metastatic stage. **b** Correlations of the proportions of FasR-expressing (FasR⁺) populations of immune cells in **a** with lymph node metastatic stage score. In **a** and **b**, the correlations were evaluated by Spearman correlation tests ($n = 16$). * $P < 0.05$ was considered significant

become clear that chemotherapy influences the proportions and phenotypes of TILs in a number of malignancies (Pelekanou et al. 2017). However, in some malignancies, the TIL distribution is not influenced by chemotherapeutic agents (Lee et al. 2015). The results of this study showed that the proportions of infiltrating immune cells in either tumoral or paratumoral tissues were not significantly different between the two groups of patients who had or had not received neoadjuvant chemotherapy. The proportions of these cells in the tumor also did not translate into a major factor that describes the patients' outcome after neoadjuvant chemotherapy, the Mandard TRG score. However, the proportions of CD4⁺ and CD8⁺ T cells significantly correlated with Mandard TRG scores in the peritumoral and adjacent healthy tissues. This unexpected finding showed that the impact of neoadjuvant chemotherapy on the immune cell signature in EC indeed goes beyond the tumor. Similar to the Mandard TRG, tumor stage was also significantly correlated with the paratumoral immune cell signature; the proportion of CD8⁺ T cells increased and the proportion of CD4⁺ T cells decreased with increasing stage.

FasR and DR3 are receptors critical for the apoptosis of TILs in EC (O'Connell 2002), and their expression on NK and T cells in the tissue compartments may be associated with EC resistance to immunotherapy (Zhu et al. 2017). Our data revealed that the expression of these receptors was observed in the tumor-affected tissue compartments and the adjacent lymph nodes. In the lymph nodes, the expression of these receptors was, however, much lower compared with that of the other three tissue compartments. Interestingly, the proportion of the double death receptor-positive CD4⁺ T cells (FasR⁺DR⁺ CD4⁺ T cells) significantly increased in the tissue compartments near the tumor and showed the highest accumulation in the tumor. This finding suggests that the tumor and its surrounding milieu may promote the expression of these receptors in these cells. In this study, the expression of these death receptors was also relevant to the patients' clinicopathological data;

the proportion of FasR/DR3-expressing NK cells in the peritumoral tissue correlated with the number of metastases, and, furthermore, the proportions of FasR-expressing NK cells and CD8⁺ T cells were increased in the tumors of active smokers.

FasR polymorphism has been shown to contribute to the risk of lung cancer (Zhang et al. 2005) and development of metastasis of EC (Sun et al. 2004). Our findings that smokers had increased proportions of FasR-expressing NK cells and CD8⁺ T cells in the tumor of EC patients and that the proportion of FasR/DR3-expressing NK cells in the peritumoral tissue correlated with the number of metastases may suggest that these polymorphisms might contribute to the risk factors and metastasis developments through the regulation of FasR and/or DR expression in these tumoral and peritumoral lymphocyte populations. Therefore, under specific disease state conditions, these death receptors can represent convenient immune targets for immunotherapy in EC (Zhu et al. 2019).

An immense effort is being made to understand the factors that dictate the outcome of cancer and cancer therapy. This efforts focused on TILs to lead to detailed examinations of the immune cell signatures in tumors and their microenvironment (de Ruiter et al. 2017; Fu et al. 2019; Hendry et al. 2017; Yao et al. 2017; Zheng et al. 2018). Our current study demonstrates that EC, its treatment, and the response to this treatment are predominantly reflected in the paratumoral immune cell signature. This was most evident in the patients who responded poorly, or not at all, to neoadjuvant chemotherapy (high-Mandard TRG score) but who showed an increased proportion of paratumoral CD8⁺ T cells. This increase might be indicative of a neoadjuvant chemotherapy-induced immune response in these high-Mandard TRG patients and may therefore provide a rationale for adjuvant immunotherapeutic interventions (Moujaess et al. 2019).

The data from this study show that the paratumoral immune environment, which stands at the interface of the tumor microenvironment and the tumor macroenvironment (Al-Zoughbi and Hoefler 2019; Al-Zoughbi et al. 2014), is significantly modulated by EC treatment and disease state conditions. The paratumoral immune environment in EC, therefore, represents a new and promising area for research into diagnostics to guide novel approaches for the development and design of personalized therapeutic algorithms that combine immunotherapy with traditional therapeutic approaches.

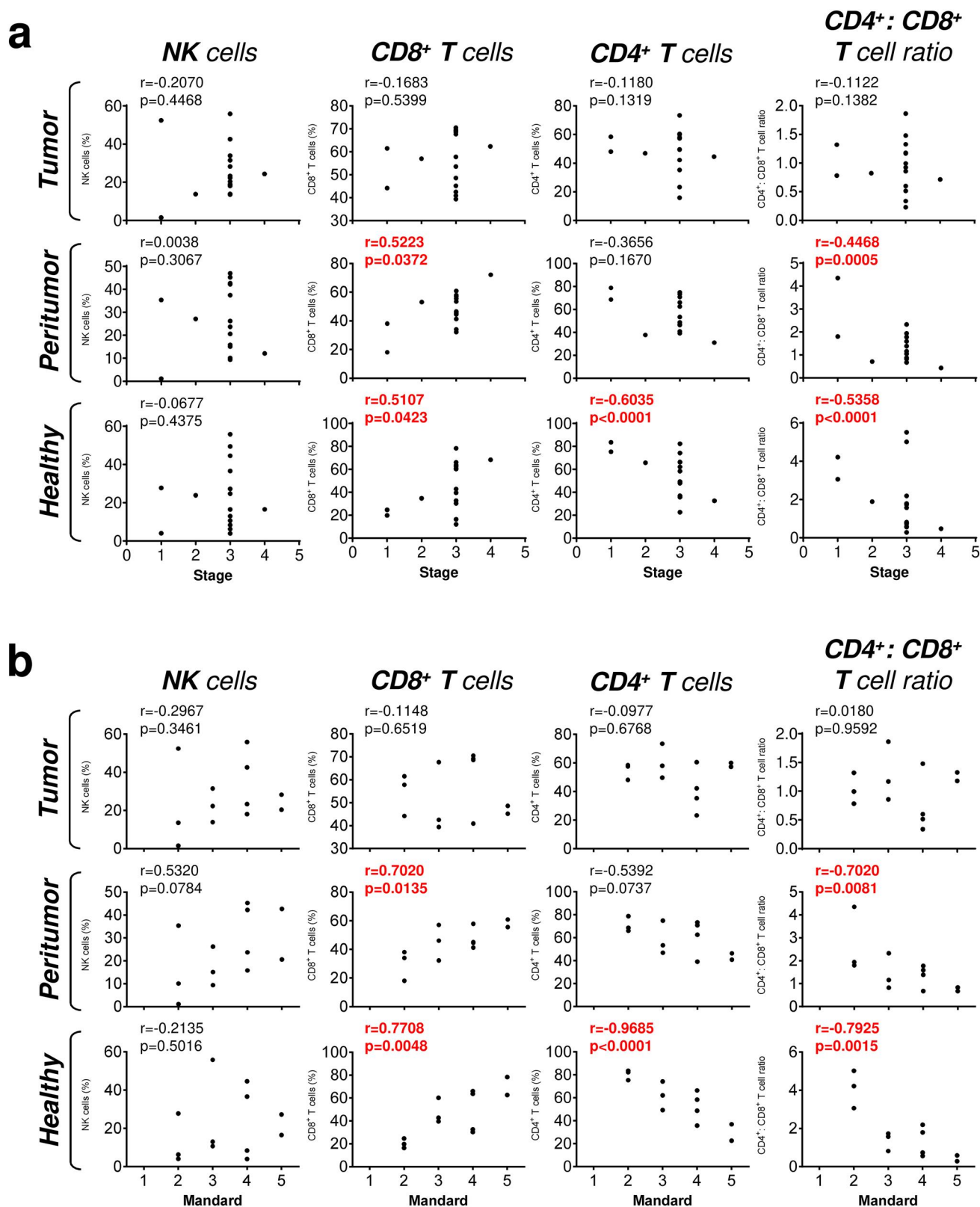


Fig. 5 Association of tumor stage score and response to neoadjuvant chemotherapy (Mandard TRG) according to the immune cells in the tumoral and paratumoral compartments. **a** Correlations of the proportions of NK cells (CD3⁺CD56⁺) and CD4⁺ and CD8⁺ T cell (CD3⁺)

populations in three EC compartments with tumor stage. **b** Correlations of the immune cells in **a** with Mandard TRG scores (Mandard). In **a** and **b**, the correlations were evaluated by Spearman correlation tests (**a**, $n = 16$; **b**, $n = 12$). * $P < 0.05$ was considered significant

Acknowledgements We thank the clinical research staff, professional laboratory staff and technicians for their assistance and Michal Rataj for assistance with the flow cytometry experiments. We also thank Prof. Ilja Striz and Dr. Alasdair M. Gilfillan for their critical review of the manuscript.

Funding Research in the authors' laboratories was supported by funding from the Charles University—project GA UK No. 364218, PRIMUS/MED/12, by funding from the Ministry of Health, Czech Republic—project AZV 16-28135A and the conceptual development fund of research organization University Hospital Motol, Prague, Czech Republic 00064203.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest J. Bartunkova is a part-time employee and a minority shareholder of Sotio, a.s., a biotech company developing cell-based immunotherapy. Z. Strizova, M. Snajdauf, D. Stakheev, P. Taborska, J. Vachtenheim Jr, J. Biskup, R. Lischke, and D. Smrz declare no conflict of interest.

Ethical approval This study was approved by the Ethics committee for multicentric studies and evaluation of the Faculty Hospital Motol, Prague, Czech Republic. All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

- Al-Zoughbi W, Hoefler G (2019) Tumor macroenvironment: an update. *Pathobiology*. <https://doi.org/10.1159/000502097>
- Al-Zoughbi W, Huang J, Paramasivan GS, Till H, Pichler M, Guertl-Lackner B, Hoefler G (2014) Tumor macroenvironment and metabolism. *Semin Oncol* 41:281–295. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.02.005>
- Badalamenti G et al (2019) Role of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with solid tumors: can a drop dig a stone? *Cell Immunol* 343:103753. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.013>
- Behr DS et al (2014) Prognostic value of immune cell infiltration, tertiary lymphoid structures and PD-L1 expression in Merkel cell carcinomas. *Int J Clin Exp Pathol* 7:7610–7621
- Bijl M, Horst G, Limburg PC, Kallenberg CG (2001) Effects of smoking on activation markers, Fas expression and apoptosis of peripheral blood lymphocytes. *Eur J Clin Invest* 31:550–553. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2001.00842.x>
- Chen K et al (2017) Tumor-infiltrating CD4+ lymphocytes predict a favorable survival in patients with operable esophageal squamous cell carcinoma. *Med Sci Monit* 23:4619–4632. <https://doi.org/10.12659/msm.904154>
- de Ruiter EJ, Ooft ML, Devriese LA, Willems SM (2017) The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology* 6:e1356148. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1356148>
- Emens LA, Middleton G (2015) The interplay of immunotherapy and chemotherapy: harnessing potential synergies. *Cancer Immunol Res* 3:436–443. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0064>
- Fridman WH, Galon J, Pages F, Tartour E, Sautes-Fridman C, Kroemer G (2011) Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates. *Cancer Res* 71:5601–5605. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1316>
- Fridman WH, Zitvogel L, Sautes-Fridman C, Kroemer G (2017) The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol* 14:717–734. <https://doi.org/10.1038/nrccli.nonc.2017.101>
- Fu Q et al (2019) Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology* 8:1593806. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1593806>
- Ge Z, Sanders AJ, Ye L, Jiang WG (2011) Aberrant expression and function of death receptor-3 and death decoy receptor-3 in human cancer. *Exp Ther Med* 2:167–172. <https://doi.org/10.3892/etm.2011.206>
- Giraldo NA et al (2015) Orchestration and prognostic significance of immune checkpoints in the microenvironment of primary and metastatic renal cell cancer. *Clin Cancer Res* 21:3031–3040. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2926>
- Hendry S et al (2017) Assessing tumor-infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the international immuno-oncology biomarkers working group: part 2: TILs in melanoma gastrointestinal tract carcinomas, non-small cell lung carcinoma and mesothelioma, endometrial and ovarian carcinomas, squamous cell carcinoma of the head and neck, genitourinary carcinomas, and primary brain tumors. *Adv Anat Pathol* 24:311–335. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000161>
- Janssen LME, Ramsay EE, Logsdon CD, Overwijk WW (2017) The immune system in cancer metastasis: friend or foe? *J Immunother Cancer* 5:79. <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0283-9>
- Koury J et al (2018) Immunotherapies: exploiting the immune system for cancer treatment. *J Immunol Res* 2018:9585614. <https://doi.org/10.1155/2018/9585614>
- Kumar R, Herbert PE, Warrens AN (2005) An introduction to death receptors in apoptosis. *Int J Surg* 3:268–277. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2005.05.002>
- Lee JY et al (2015) Association between chemotherapy-response assays and subsets of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer: a pilot study. *J Gastric Cancer* 15:223–230. <https://doi.org/10.5230/jgc.2015.15.4.223>
- Lee H et al (2019) Integrated molecular and immunophenotypic analysis of NK cells in anti-PD-1 treated metastatic melanoma patients. *Oncoimmunology* 8:e1537581. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1537581>
- Miksch RC et al (2019) Prognostic impact of tumor-infiltrating lymphocytes and neutrophils on survival of patients with upfront resection of pancreatic cancer. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers11010039>
- Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM (2016) The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs—part A: renal penile, and testicular tumours. *Eur Urol* 70:93–105. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.029>
- Moujaess E, Haddad FG, Eid R, Kourie HR (2019) The emerging use of immune checkpoint blockade in the adjuvant setting for solid tumors: a review. *Immunotherapy*. <https://doi.org/10.2217/imt-2019-0087>
- Napier KJ, Scheerer M, Misra S (2014) Esophageal cancer: a review of epidemiology, pathogenesis, staging workup and treatment modalities. *World J Gastrointest Oncol* 6:112–120. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v6.i5.112>
- O'Connell J (2002) Fas ligand and the fate of antitumour cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 105:263–266. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01379.x>

- Park CK, Kim SK (2017) Clinicopathological significance of intratumoral and peritumoral lymphocytes and lymphocyte score based on the histologic subtypes of cutaneous melanoma. *Oncotarget* 8:14759–14769. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14736>
- Park MH, Song MJ, Cho MC, Moon DC, Yoon DY, Han SB, Hong JT (2012) Interleukin-32 enhances cytotoxic effect of natural killer cells to cancer cells via activation of death receptor 3. *Immunology* 135:63–72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03513.x>
- Pelekanou V et al (2017) Effect of neoadjuvant chemotherapy on tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in breast cancer and its clinical significance. *Breast Cancer Res* 19:91. <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0884-8>
- Peter ME, Hadji A, Murmann AE, Brockway S, Putzbach W, Pattanayak A, Ceppi P (2015) The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death Differ* 22:549–559. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.3>
- Rice TW, Patil DT, Blackstone EH (2017) 8th edition AJCC/UICC staging of cancers of the esophagus and esophagogastric junction: application to clinical practice. *Ann Cardiothorac Surg* 6:119–130. <https://doi.org/10.21037/acs.2017.03.14>
- Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A (2017) Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. *Cell* 168:707–723. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.017>
- Short MW, Burgers KG, Fry VT (2017) Esophageal cancer. *Am Fam Physician* 95:22–28
- Sorbye SW et al (2012) Prognostic impact of peritumoral lymphocyte infiltration in soft tissue sarcomas. *BMC Clin Pathol* 12:5. <https://doi.org/10.1186/1472-6890-12-5>
- Steele KE et al (2018) Measuring multiple parameters of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in human cancers by image analysis. *J Immunother Cancer* 6:20. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0326-x>
- Strizova Z et al (2019) NK and T cells with a cytotoxic/migratory phenotype accumulate in peritumoral tissue of patients with clear cell renal carcinoma. *Urol Oncol* 37:503–509. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2019.03.014>
- Sudo T et al (2017) Clinical impact of tumor-infiltrating lymphocytes in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 24:3763–3770. <https://doi.org/10.1245/s10434-017-5796-4>
- Sun T, Miao X, Zhang X, Tan W, Xiong P, Lin D (2004) Polymorphisms of death pathway genes FAS and FASL in esophageal squamous-cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 96:1030–1036. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh187>
- Tamura R, Ohara K, Sasaki H, Morimoto Y, Kosugi K, Yoshida K, Toda M (2018) Difference in immunosuppressive cells between peritumoral area and tumor core in glioblastoma. *World Neurosurg* 120:e601–e610. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.08.133>
- Thies S, Langer R (2013) Tumor regression grading of gastrointestinal carcinomas after neoadjuvant treatment. *Front Oncol* 3:262. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00262>
- Wang Z et al (2017) Infiltrating CD4/CD8 high T cells shows good prognostic impact in pancreatic cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 10:8820–8828
- Wang K, Shen T, Siegal GP, Wei S (2017) The CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes at the tumor-host interface has prognostic value in triple-negative breast cancer. *Hum Pathol* 69:110–117. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.09.012>
- Xie J et al (2016) Expression of immune checkpoints in T cells of esophageal cancer patients. *Oncotarget* 7:63669–63678. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11611>
- Yao W, He JC, Yang Y, Wang JM, Qian YW, Yang T, Ji L (2017) The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 7:7525. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08128-1>
- Zancoppe E et al (2010) Differential infiltration of CD8+ and NK cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 39:162–167. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2009.00792.x>
- Zhang H, Chen J (2018) Current status and future directions of cancer immunotherapy. *J Cancer* 9:1773–1781. <https://doi.org/10.7150/jca.24577>
- Zhang X et al (2005) Functional polymorphisms in cell death pathway genes FAS and FASL contribute to risk of lung cancer. *J Med Genet* 42:479–484. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.030106>
- Zheng X et al (2018) Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in esophagus cancer: a meta-analysis. *Cell Physiol Biochem* 45:720–732. <https://doi.org/10.1159/000487164>
- Zhu J et al (2017) Resistance to cancer immunotherapy mediated by apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes. *Nat Commun* 8:1404. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00784-1>
- Zhu J, Petit PF, Van den Eynde BJ (2019) Apoptosis of tumor-infiltrating T lymphocytes: a new immune checkpoint mechanism. *Cancer Immunol Immunother* 68:835–847. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2269-y>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

2.3.2 Práce s názvem „The TRAIL in the Treatment of Human Cancer: An Update on Clinical Trials“

Molekuly TRAIL mají schopnost aktivovat apoptózu buněk nezávisle na dráze p53, což je považováno za jejich velkou terapeutickou výhodu, protože gen kódující protein p53 je u rakoviny často mutován.

Výjimku však představují nádory s mutací KRAS, kde bylo zjištěno, že signalizace TRAIL zvyšuje invazi a metastázování nádorových buněk.

Dva hlavní terapeutické přístupy jsou založeny buď na podávání agonistů TRAIL-receptoru (TRAIL-R), nebo rekombinantního TRAIL. Zdá se však, že tyto přístupy mají omezenou terapeutickou účinnost a pouze několik léků vstoupilo do fáze II klinických studií.

Napříč agonistickými monoklonálními protilátkami proti TRAIL-R1 receptoru pouze mapatumumab (protilátka HGS-ETR1) dosáhl druhé fáze klinického testování. Mapatumumab prokázal dobrý bezpečnostní profil, a navíc způsobil kompletní nebo částečnou klinickou odpověď při podávání v monoterapii u pacientů s folikulárním non-Hodgkinovým lymfomem. Stabilita onemocnění byla dosažena u 30 % pacientů.

Původně slibné TRAIL-R2 agonistické protilátky tigatuzumab a conatumumab neprokázaly protinádorovou účinnost in vivo. Předpokládá se, že nízká účinnost konvenčních TRAIL-R1/R2 protilátek spočívá v nedostatečné kapacitě těchto látek vyvolat shlukování TRAIL-R, které je nezbytné pro indukci apoptózy.

Mechanismus účinku rekombinantního rozpustného TRAIL proteinu je založen na jeho vazbě na TRAIL-R1 a TRAIL-R2 vedoucí k následné aktivaci kaspáz a apoptotické buněčné smrti. Hlavním limitem se zdá být jeho rychlé vylučování ze séra.

Dulanermin, první rozpustná rekombinantní verze přirozeně se vyskytujícího lidského proteinu TRAIL, prokázal svoji účinnost v randomizované studii u pacientů s pokročilým nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC). V kombinaci s chemoterapií prodloužil progression-free survival (PFS) oproti placebu s chemoterapií (6,4 měsíců vs. 3,5 měsíců), a to při stejném výskytu vedlejších účinků v obou skupinách.

Slibný efekt ukazují duálně působící deriváty TRAIL s receptorem pro nádorový antigen (epidermální růstový faktor, mesotelin) nebo antigen imunitních buněk (CD25, CD47, PD-L1).

U nádorů rezistentních na TRAIL terapii je možné dosáhnout jejich senzitivace kombinací s chemoterapií nebo radioterapií. U nádorů krku maputumumab s radioterapií zvýšil apoptózu buněk z 51 na 83 % oproti samotnému maputumumabu.

Vyšší aktivace apoptotické dráhy TRAIL lze dosáhnout podáváním terapie TRAIL spolu s dalšími látkami zvyšujícími expresi TRAIL a/nebo jeho receptorů DR4 a DR5. Z těchto látek je nejslibnější sulforafane, testovaný v několika klinických studiích.

The TRAIL in the Treatment of Human Cancer: An Update on Clinical Trials

Martin Snajdauf¹, Klara Havlova², Jiri Vachtenheim Jr.¹, Andrej Ozaniak¹, Robert Lischke¹, Jirina Bartunkova³, Daniel Smrz³ and Zuzana Strizova^{3*†}

¹Third Department of Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czechia,

²Department of Urology, Second Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czechia,

³Department of Immunology, Second Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czechia

OPEN ACCESS

Edited by:

William C Cho,
QEH, Hong Kong

Reviewed by:

Olivier Micheau,
Université de Bourgogne, France
Diego De Miguel,
Universidad de Zaragoza, Spain
Alberto Anel,
University of Zaragoza, Spain

*Correspondence:

Zuzana Strizova
zuzana.strizova@fnmotol.cz

†ORCID:

Zuzana Strizova
orcid.org/0000-0003-4976-9534

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular Diagnostics and
Therapeutics,
a section of the journal
Frontiers in Molecular Biosciences

Received: 11 November 2020

Accepted: 03 February 2021

Published: 10 March 2021

Citation:

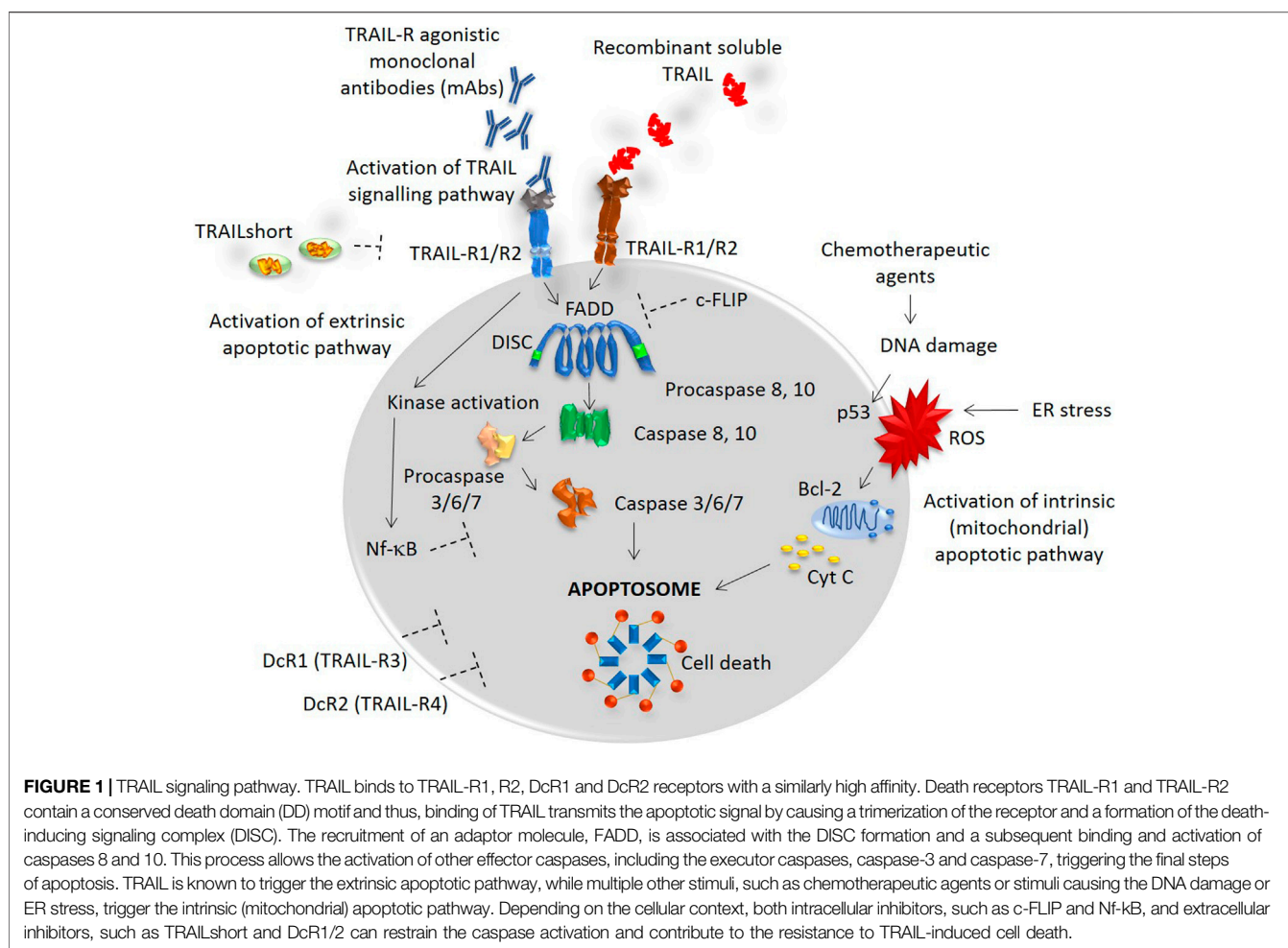
Snajdauf M, Havlova K, Vachtenheim J, Ozaniak A, Lischke R, Bartunkova J, Smrz D and Strizova Z (2021) The TRAIL in the Treatment of Human Cancer: An Update on Clinical Trials. *Front. Mol. Biosci.* 8:628332. doi: 10.3389/fmolb.2021.628332

TRAIL (tumor-necrosis factor related apoptosis-inducing ligand, CD253) and its death receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 selectively trigger the apoptotic cell death in tumor cells. For that reason, TRAIL has been extensively studied as a target of cancer therapy. In spite of the promising preclinical observations, the TRAIL-based therapies in humans have certain limitations. The two main therapeutic approaches are based on either an administration of TRAIL-receptor (TRAIL-R) agonists or a recombinant TRAIL. These approaches, however, seem to elicit a limited therapeutic efficacy, and only a few drugs have entered the phase II clinical trials. To deliver TRAIL-based therapies with higher anti-tumor potential several novel TRAIL-derivates and modifications have been designed. These novel drugs are, however, mostly preclinical, and many problems continue to be unraveled. We have reviewed the current status of all TRAIL-based monotherapies and combination therapies that have reached phase II and phase III clinical trials in humans. We have also aimed to introduce all novel approaches of TRAIL utilization in cancer treatment and discussed the most promising drugs which are likely to enter clinical trials in humans. To date, different strategies were introduced in order to activate anti-tumor immune responses with the aim of achieving the highest efficacy and minimal toxicity. In this review, we discuss the most promising TRAIL-based clinical trials and their therapeutic strategies.

Keywords: TRAIL clinical trials, recombinant TRAIL, TRAIL-receptor agonists, cancer, dulanermin, mapatumumab

INTRODUCTION

Several therapeutic strategies are currently subjected to testing with the aim to trigger the antitumor immune responses (Zhang and Zhang, 2020; Nagai and Kim, 2017). TRAIL (tumor—necrosis factor related apoptosis-inducing ligand, CD253) is a protein initially described to selectively trigger extrinsic apoptotic pathway in malignant cells (Micheau et al., 2013). Moreover, TRAIL engages the apoptosis of tumor cells in a p53 independent manner, unlike most of chemotherapeutic drugs (Micheau et al., 2013; Willms et al., 2019). TRAIL has a sequence homology to TNF (tumor necrosis factor) and Fas ligand and, as a member of the tumor necrosis factor superfamily, binds to death receptors DR4 (TRAIL-R1) and DR5 (TRAIL-R2), decoy receptors DcR1 and DcR2, and osteoprotegerin (OPG) (Yuan et al., 2018). Death receptors DR4 and DR5 bear agonistic properties due to their intracellular death domain (DD) which transmits the apoptotic signal.



DcR1, DcR2 and OPG, on the other hand, lack DD and, therefore, act as regulatory receptors. TRAIL is naturally found as a trimer which induces oligomerization of its receptors (Dubuisson and Micheau, 2017).

TRAIL exists in two forms: the membrane-bound TRAIL (mTRAIL) and the soluble TRAIL (sTRAIL). Both forms can be found in different leukocyte subpopulations (Ehrlich et al., 2003). The binding of TRAIL to its death receptors, DR4 and DR5, causes a homotypic DD-dependent recruitment of Fas-associated protein with death domain (FADD). FADD bridges the pro-caspases 8 and 10 to form a death-inducing signaling complex (DISC), **Figure 1**. DISC further activates the caspase-8 which directly enables the activation of other effector caspases, including the executor caspases, caspase-3 and caspase-7 triggering the final steps of apoptosis (Gasparini et al., 2013). Since the apoptosis mediated by TRAIL is known to trigger the extrinsic signaling pathway, its combination with conventional chemotherapeutic drugs seems particularly relevant as they engage the intrinsic (mitochondrial) apoptotic pathway, **Figure 1**. To note, most stimuli induce apoptosis via the mitochondrial pathway (Lopez and Tait, 2015).

Within the cytoplasm, a number of inhibitors are recruited depending on the cellular context. The inhibitors, such as c-FLIP [cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme)-

inhibitory protein], Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), or DcR1/DcR2 can restrain the caspase activation and lead to the TRAIL-mediated apoptosis resistance, **Figure 1** (Dubuisson and Micheau, 2017).

The mTRAIL and sTRAIL have been reported to recruit multiple procaspase molecules leading to the tumor cell death *in vitro* and *in vivo* (Ehrlich et al., 2003). Interestingly, it has been also revealed that signaling through FADD and DR5 (TRAIL-R2) serves as the key mechanism of chimeric antigen receptor (CAR) T cell cytotoxicity (Dufva et al., 2020). The ability of TRAIL to promote pro-tumorigenic activity against tumor cells regardless of their p53 status is thought to be the major advantage of TRAIL-based therapies (Dubuisson and Micheau, 2017).

The exception, however, is represented by KRAS-mutated cancers where TRAIL signaling was newly found to mediate migration, invasion, and metastasis. Even though studies have already proven that recombinant human TRAIL enhances the tumor sensitivity to chemotherapy/targeted therapy/radiotherapy in various cancer types, this may not apply to KRAS-mutated cancers (Yuan et al., 2018; von Karstedt and Walczak, 2020; Pal et al., 2016). KRAS-mutated cancers express high levels of TRAIL with the ability to promote tumor growth. Also, the activation of NF- κ B signaling pathway by KRAS was found to interfere with

TABLE 1 | Phase II and III clinical trials with TRAIL-R agonistic antibodies, multivalent antibodies, recombinant TRAIL, and TRAIL derivatives and modifications.

Drug name	Diagnosis	Mechanism of action	Trial design	Setting	Dosage regimen	Nr. of participants	Study completion	ID
Trail-R agonistic antibodies: phase II clinical trials								
Mapatumumab	Advanced hepatocellular carcinoma	Monoclonal antibody targeting TRAIL-R1	A randomized, multi-center, blinded, placebo-controlled study	Combination therapy (Sorafenib, First-line)	30 mg/kg i.v. on day 1 of each 21-days cycle	101 pts. (>18 yrs.)	November 2017	NCT01258608
Mapatumumab	Multiple myeloma	Monoclonal antibody targeting TRAIL-R1	Multi-center, open-label, randomized study	Combination therapy (Bortezomib)	10 mg/kg i.v. on day 1 of each 21-days cycle	105 pts. (>18 yrs.)	October 2010	NCT00315757
Mapatumumab	Relapsed or refractory non-hodgkin's lymphoma	Monoclonal antibody targeting TRAIL-R1	A multi-center, open-label, dose-escalation study	Monotherapy	10 mg/kg i.v. on day 1 of each 21-days cycle	40 pts. (>18 yrs.)	May 2007	NCT00094848
Mapatumumab	Advanced non-small cell lung cancer	Monoclonal antibody targeting TRAIL-R1	Randomized, Multi-Center, Open-Label Study	Combination therapy (Carboplatin, Paclitaxel), First-line	10 mg/kg i.v. on day 1 of each 21-days cycle	111 pts. (>18 yrs.)	February 2011	NCT00583830
Tigatuzumab	Metastatic or unresectable non-small cell lung cancer	Monoclonal antibody targeting TRAIL-R2	Randomized, double-blinded, placebo controlled	Combination therapy (Carboplatin/Paclitaxel)	10 mg/kg	109 pts. (>18 yrs.)	December 2011	NCT00991796
Tigatuzumab	Pancreatic Cancer	Monoclonal antibody targeting TRAIL-R2	Phase 2 multicenter, open-label study	Combination therapy (Gemcitabine)	8 mg/kg loading dose followed by 3 mg/kg weekly	65 pts. (>18 yrs.)	December 2008	NCT00521404
Tigatuzumab	Metastatic triple negative breast cancer	Monoclonal antibody targeting TRAIL-R2	An open label, randomized study	Combination therapy (Abraxane)	10 mg/kg loading dose; 5 mg/kg for the 1st cycle, then every other week on Days 1 and 15 for subsequent cycles	64 pts. (>18 yrs.)	June 2017	NCT01307891
Conatumumab	Pancreatic cancer	Monoclonal antibody targeting TRAIL-R2	Randomized, double-blind study	Combination therapy (Gemcitabine)	10 mg/kg	138 pts. (>18 yrs.)	April 2012	NCT00630552
Multivalent antibodies: phase II clinical trials								
Gen1029	Colorectal cancer non-small cell lung cancer triple negative breast cancer renal cell carcinoma gastric cancer pancreatic cancer	1:1 mixture of two humanized non-competing DR5-specific mAbs, each carrying an E430G hexamerization-enhancing mutation	Randomized, open-label, multicenter study	Monotherapy	Intravenously once every 14 days, starting dose + escalation steps	520 pts. (>18 yrs.)	Estimated March 2022	NCT03576131
Recombinant TRAIL: phase II clinical trials								
Dulanermin	B-Cell non-hodgkin's lymphomas that have progressed following previous rituximab therapy	Recombinant TRAIL triggering apoptosis via activation of DR4 and DR5	Randomized, open-label, multicenter study	Combination therapy (Rituximab)	8.0 mg/kg/day dose i.v. for 5 consecutive days at the start of each 21-days cycle	72 pts. (>18 yrs.)	May 2010	NCT01258608

(Continued on following page)

TABLE 1 | (Continued) Phase II and III clinical trials with TRAIL-R agonistic antibodies, multivalent antibodies, recombinant TRAIL, and TRAIL derivatives and modifications.

Drug name	Diagnosis	Mechanism of action	Trial design	Setting	Dosage regimen	Nr. of participants	Study completion	ID
Dulanermin	Previously untreated stage IIIB/IV non-small cell lung cancer (NSCLC)	Recombinant TRAIL triggering apoptosis via activation of DR4 and DR5	A multicenter, open label, randomized study	Combination therapy (Bevacizumab, Paclitaxel, Carboplatin), First-line	20 mg/kg on days 1–2 per 21 days cycle	213 pts. (>18 yrs.)	November 2011	NCT00315757
Recombinant TRAIL: phase III clinical trials								
Dulanermin	Advanced non-small cell lung cancer	Recombinant TRAIL triggering apoptosis via activation of DR4 and DR5	A randomized, double-blind, placebo-controlled study	Monotherapy	150 µg/kg/d IV (in the vein), on day 1 to 7 of each 21 days cycle	417 pts. (>18 yrs.)	June 2018	NCT00583830
Trail derivatives and modifications: phase II clinical trials								
MSC-TRAIL	Non-small cell lung cancer (NSCLC)	Targeted stem cells expressing TRAIL	Multicentre, randomised double blind placebo controlled	Combination therapy (pemetrexed/cisplatin chemotherapy)	Not specified	46 pts. (>18 yrs.)	Estimated September 2025	NCT03298763
CPT	Relapsed and refractory multiple myeloma	Circularly permuted TRAIL triggering apoptosis via activation of DR4 and DR5	A multicenter, open label study	Combination therapy (Thalidomide)	5–10 mg/kg; thalidomide 100 mg	43 pts. (>18 yrs.)	2014	ChiCTR0NC-1200206

the pro-apoptotic abilities of TRAIL-induced signaling (Wajant, 2004; Yang et al., 2016).

Nevertheless, it has been demonstrated that the resistance of KRAS-mutated cancers to the induction of apoptosis by exogenous TRAIL can be overcome by inhibiting the endogenous TRAIL (von Karstedt and Walczak, 2020). The therapeutic targeting of endogenous TRAIL signaling, thus, opens novel perspectives in the treatment options of KRAS-mutated cancers (von Karstedt and Walczak, 2020).

In parallel, a novel splice variant of TRAIL, named TRAILshort, was recently reported to antagonize the pro-apoptotic effects of TRAIL (Aboulnasr et al., 2020). The TRAILshort can be found in extracellular vesicles and serves as a dominant negative ligand for DR4 and DR5, **Figure 1** (Aboulnasr et al., 2020).

In the following text, we will present the current status of all TRAIL-based monotherapies and combination therapies that have reached phase II and phase III clinical trials in humans. We will also discuss the novel TRAIL derivatives and modifications that may enter clinical trials in the nearest future.

TRAIL-R AGONISTIC ANTIBODIES

TRAIL-R agonistic monoclonal antibodies bind specifically to either TRAIL-R1 (DR4) or TRAIL-R2 (DR5) with high affinity. The mechanism of action via TRAIL-R agonistic antibodies has been shown in preclinical models to induce also the antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and complement-dependent cytotoxicity (CDC) (Qiu et al., 2012; Dai et al., 2015). However, to date, a single-phase III study has not been carried out (clinicaltrials.gov).

TRAIL-R1 Agonistic Antibodies

While different agonistic TRAIL-R1 antibodies have been developed, such as HS101, 4HS, or 4G7, only HGS-ETRI antibody, also known as mapatumumab, has entered clinical trials in humans and has reached the second phase of clinical testing (Dai et al., 2015; Medler et al., 2019; Chuntharapai et al., 2001). Mapatumumab was reported to be well tolerated up to 20 mg/kg daily and has already been tested in the treatment of non-small cell lung carcinoma (NSCLC), multiple myeloma, non-Hodgkin's lymphoma, and hepatocellular carcinoma, **Table 1**. In phase I, as well as in phase II clinical trials, mapatumumab has shown a great safety profile and, furthermore, caused complete or partial clinical responses when administered as monotherapy in patients with follicular non-Hodgkin's lymphoma (Younes et al., 2010). The stability of the disease was achieved in 30% of the patients (Younes et al., 2010). The efficacy of mapatumumab, however, was not supported by other phase II clinical trials, and to date, phase III clinical trials with mapatumumab have not yet been initiated.

The efficacy of combination therapies with mapatumumab was assessed throughout various malignancies (Micheau et al., 2013). Most of the combinations, such as mapatumumab with paclitaxel, gemcitabine, carboplatin or bortezomib, however, did not improve the response rate compared to each compound alone (Micheau et al., 2013).

TRAIL-R2 Agonistic Antibodies

So far, several clinical trials with agonistic TRAIL-R2 antibodies have been carried out. Among TRAIL-R2 targeting agents, zaptuzumab, KMTR2, or DJR2 have not yet been tested in humans (Pal et al., 2016; Aboulnasr et al., 2020;

Qiu et al., 2012). Both zaptuzumab and KMTR2 have, however, shown the ability to trigger apoptosis in the absence of TRAIL-R2 crosslinking (Dubuisson and Micheau, 2017). Lexatumumab, drozitumab, and LBY-135, have completed the phase I clinical trials, and tigatuzumab and conatumumab entered the phase II of clinical testing, **Table 1**. The targeted cancers were pancreatic cancer, breast cancer, and lung cancer. Even with the encouraging results with TRAIL agonists *in vitro*, tigatuzumab and conatumumab treatment results *in vivo* were rather disappointing (Cohn et al., 2013; Forero-Torres et al., 2013; Fuchs et al., 2013; Reck et al., 2013). Whereas both agents were well tolerated, the anticipated anti-cancer effect was not attained (Forero-Torres et al., 2013; Fuchs et al., 2013; Reck et al., 2013). In advanced NSCLC patients, tigatuzumab did not improve the efficacy of carboplatin/paclitaxel (Reck et al., 2013). In patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma, the study group with conatumumab administration had a negligibly higher 6-month survival rate (59%) as compared to the placebo (50%) (Kindler et al., 2012). Interestingly, conatumumab was found to decrease the OR rate of doxorubicin and the results from clinical trials evaluating conatumumab with other pharmacological agents, such as paclitaxel, carboplatin and panitumumab, have not been divulged yet (NCT00630786, NCT00534027).

Of note is a promising phase I clinical trial with a novel TRAIL-R2 antibody DS-8273a which was terminated in 2017 for non-specified reasons. In this study, four colorectal carcinoma patients were administered the DS-8273a in a combination with anti-PD-1 agent nivolumab. The results were not published (NCT02991196). Currently, an open-label, multicenter, phase I study with a novel recombinant humanized tetravalent antibody targeting TRAIL-R2 is recruiting patients with locally advanced or metastatic solid tumors, including sarcomas (NCT03715933).

Novel Multivalent-Based Antibodies

The administration of conventional TRAIL-R1/R2 agonistic antibodies has not yet resulted in an improved survival of cancer patients in clinical trials. It is presumed that the main hurdle lies in an insufficient capacity of these agents to induce TRAIL-R clustering which is essential for the apoptosis induction (Dubuisson and Micheau, 2017). For that reason, multivalent anti-DR4 (TRAIL-R1) and anti-DR5 (TRAIL-R2) antibodies were designed and almost instantly showed superior efficacy as compared to monovalent and divalent antibodies (Dubuisson and Micheau, 2017). A tetravalent sc-Fv:DR5 derivate and a single-chain scFv:DR5 nanobody represented the most promising agents in preclinical models, however, the scFv:DR5 nanobody was associated with hepatotoxicity in phase I. clinical trials (Liu et al., 2015; Papadopoulos et al., 2015). Another promising agent, a DR4/DR5 dual-specific Kringle domain, is expected to enter clinical trials due to its ability to induce TRAIL- and reactive oxygen species (ROS)-mediated cell death (Jeong et al., 2014). Moreover, other bi-DR4/5 specific antibodies are currently being developed (Dobson et al., 2009). To date, more phase I clinical trials

are currently ongoing with DR5-specific HexaBody molecules (NCT03576131), a tetravalent anti-DR5 INBRX-109 (NCT03715933) or with a multivalent IgM DR5 agonist (NCT04553692) for the treatment of solid tumors. The approach to design an antibody cross-reactive to both DR4 and DR5 displayed only limited therapeutic potential *in vitro* (Dubuisson and Micheau, 2017). Bi-specific antibodies were tested across various malignancies and promising preclinical results were achieved with MCSP (melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan) and DR5 bispecific, tetravalent antibody which allowed a selective DR5-dependent apoptosis induction in the MCSP-expressing melanoma cells (Dobson et al., 2009; He et al., 2016; Dubuisson and Micheau, 2017).

RECOMBINANT TRAIL

The mechanism of action of recombinant soluble TRAIL protein is based on its binding to TRAIL-R1 and TRAIL-R2 leading to subsequent activation of caspases and the apoptotic cell death (Zhang et al., 2010). The main limitation of the systematically applied soluble TRAIL appears to be in its rapid clearance from the serum (Lemke et al., 2014). The results with recombinant TRAIL, however, are so far encouraging, **Table 1**.

Dulanermin

Dulanermin is the first soluble recombinant version of the naturally occurring human protein TRAIL (Quintavalle and Condorelli, 2012). Dulanermin has reached phase II in patients with NSCLC and B-cell lymphomas (Soria et al., 2011; Cheah et al., 2015). A phase III clinical trial with 452 stage IIIB and stage IV NSCLC patients as monotherapy has been completed in 2018 (NCT03083743). In this randomized, placebo-controlled clinical trial, the patients were randomly assigned to receive either dulanermin plus chemotherapy (vinorelbine and cisplatin) or placebo plus chemotherapy. In this study, the addition of dulanermin to chemotherapy in patients with untreated advanced NSCLC improved PFS (6.4 months vs. 3.5 months in the placebo arm). Moreover, the results applied for all patients in the dulanermin arm and were consistent across all clinical subgroups (Ouyang et al., 2018). This synergic potential of dulanermin was also reflected in the increased objective response rate (ORR). In addition, the incidence of adverse events did not differ between the two study arms. At the time of analysis, however, the OS was not improved in the dulanermin arm as compared to the placebo arm (Ouyang et al., 2018). Another recombinant TRAIL variant which has entered the clinical trials was circularly permuted TRAIL, also known as CPT (Micheau et al., 2013). Early clinical trials showed great tolerability with CPT alone or in combination therapy (Micheau et al., 2013). Moreover, CPT exhibited more robust pro-apoptotic activity than dulanermin (Fang et al., 2005). However, patients who were enrolled in the second phases of clinical testing experienced mostly partial responses, whereas novel severe side effects were reported, such as CPT-mediated liver injury (Chen et al., 2012).

SCB-313

SCB-313 is a recombinant fully-human TRAIL-trimer fusion protein administered to patients for the first time at the end of 2019 (NCT04123886). Five clinical trials with SCB-313 are currently recruiting patients with the following indications: malignant ascites, peritoneal carcinomatosis, and malignant pleural effusions (clinicaltrials.gov). The efficacy and safety of SCB-313, therefore, remains to be determined.

TRAIL Derivates

Several TRAIL derivates have been designed to allow better target specificity. Single-chain variable fragments of TRAIL (scFv-TRAIL) were described to increase the tumor-killing efficiency and were initially divided into two major groups. The first group of molecules allows dual targeting by construction of scFv-TRAIL associated with a tumor-associated antigen, such as epidermal growth factor (EGFR), multidrug resistance protein (MRP3), mesothelin and others (Dubuisson and Micheau, 2017). The second group of scFvs molecules represents recombinant proteins with the ability to target immune cell antigens, such as CD25, CD47, PD-L1 and multiple others (Dubuisson and Micheau, 2017).

In the case of scFv-PD-L1:TRAIL derivate, the TRAIL-mediated apoptosis is accompanied by a checkpoint inhibition leading to an increased T cell activation (Hendriks et al., 2016). Novel TRAIL derivates are very promising and clinical trials are urgently needed.

TRAIL-Conjugates, Fusion Proteins and Genetically Engineered Modifications

To overcome TRAIL resistance, several attempts to conjugate TRAIL with cytotoxic drugs were carried out. So far, a TRAIL conjugate with monomethyl auristatin E (MMAE), the TRAIL-MMAE, was shown to deliver a potent antitumor response in breast carcinoma xenograft animal models (Pan et al., 2015). Moreover, the TRAIL-MMAE exhibited great pharmacokinetic abilities with minimal toxicity (Pan et al., 2015). Encouraging results were also observed in animal models treated with AD-053.2, a TRAIL conjugate with mitochondrial protein Smac/DIABLO which potentiates different forms of apoptosis (Pieczykolan et al., 2014).

Recently, a fusion protein ABBV-621 composed of three TRAIL receptor binding domains and an Fc domain of a human immunoglobulin G (IgG) entered a phase I clinical trial both in monotherapy and in combination therapies (NCT03082209). Multiple study arms evaluated the ABBV-621 efficacy in the treatment of solid or hematological malignancies (Ratain et al., 2019). The preliminary results released by the investigators suggested mostly the capability of ABBV-621 to maintain a disease stability (Calvo et al., 2019; Ratain et al., 2019).

Another novel approach with targeted stem cells expressing TRAIL, MSC-TRAIL, has been introduced in a study initiated in 2019 (NCT03298763). The results of the second phase are eagerly awaited.

Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy has revolutionized the treatment of advanced B cell leukaemias and lymphomas (Pehlivan et al., 2018; Mika et al., 2020). This novel approach of genetically engineered T cells allows T cells to bind in an antibody-like manner without MHC

molecules, which provides cancer specificity and a high-binding efficacy (Feins et al., 2019). To date, CAR T cells targeting TRAIL receptors were profoundly discussed, however, only a single agent, TR1-svFv-CAR was constructed and evaluated in an *in vitro* setting (Kobayashi et al., 2014). In this model, TR1-svFv-CAR exhibited cytolytic activity toward DR4-deficient Jurkat cells, peripheral blood cells and NK cell lines (Kobayashi et al., 2014).

COMBINATION STRATEGIES

It has been reported that some cancers are TRAIL-therapy resistant for various reasons (Qiu et al., 2012; Dai et al., 2015; Wajant, 2019). In such cases, a combination strategy may provide a rationale for sensitizing the tumor microenvironment to TRAIL-therapies, and either chemotherapy or different therapeutic approach may serve as the pharmacological modulator.

Chemotherapy and Radiotherapy

Both TRAIL agonistic antibodies and recombinant TRAIL have proven good safety profiles and, therefore, can be easily combined with chemotherapy and/or radiotherapy.

In cervical cancer cell lines, mapatumumab in combination with irradiation enhanced the cell apoptosis from 51 to 83%, compared to mapatumumab alone (NCT01088347). The initial studies indicated that even though some tumors are primary TRAIL-resistant, chemotherapy or radiotherapy may overcome the resistance (Quintavalle and Condorelli, 2012). This was partially supported by a recent study, where the addition of dulanermin to chemotherapy provided superior clinical benefits for patients with advanced NSCLC (Ouyang et al., 2018).

Immunotherapy, Biological Therapy and Targeted Therapy

Immunotherapy, biological therapy, and targeted therapy have significantly improved the OS in various malignancies and were shown to largely affect the tumor microenvironment (Schirrmacher, 2019; Hirata and Sahai, 2017). Therefore, these approaches may support the TRAIL-based therapies by overcoming the tumor cell resistance to TRAIL. The synergistic effect of targeted therapy has been observed in mapatumumab studies (NCT01258608, NCT00315757), whereas biological therapy was mostly applied in combinations with dulanermin (NCT00400764, NCT00508625). A single-phase I trial with a monoclonal antibody targeting TRAIL-R2 administered together with checkpoint immunotherapy was terminated in 2017 (NCT02991196).

MODULATION OF THE TRAIL EXPRESSION AND SIGNALING

Researchers highlighted that the activation of the TRAIL apoptotic pathway could be achieved by administering TRAIL therapy together with other agents increasing the expression of

TRAIL and/or its receptors DR4 and DR5 (von Karstedt and Walczak, 2020; Dai et al., 2015; Wajant, 2019). As it is known that TRAIL signaling pathway is shaped by the $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ signaling pathway, the modulation of the $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ signaling was used to affect the TRAIL responses *in vivo* and to sensitize the tumor to TRAIL-induced apoptosis. For that purpose, sulforaphane, melittin, resveratrol, wogonin, and multiple other components were tested (Dai et al., 2015). Six clinical trials are currently ongoing and/or recruiting with the use of sulforaphane in the treatment of cancer (clinicaltrials.gov).

DISCUSSION

TRAIL and its death receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 trigger the apoptotic cell death in tumor cells without damaging non-malignant cells. This phenomenon has been illustrated in a number of *in vitro* and *in vivo* studies (Yuan et al., 2018; von Karstedt & Walczak, 2020; Dai et al., 2015; de Miguel et al., 2016).

The mechanism underlying the selective induction of apoptosis in tumor cells has not yet been elucidated, even though the significantly higher expression of TRAIL's decoy receptors in non-malignant cells may provide some answers (Micheau et al., 2013).

Because the gene encoding protein p53 is often mutated in cancers, TRAIL's ability to activate apoptosis independently of the p53, together with its tumor-selectivity, made TRAIL an attractive therapeutic target (Elmore, 2007; Lim et al., 2019). Yet, owing to TRAIL's ability to bind to four TRAIL receptors with a similarly high affinity, the understanding of TRAIL signaling regulation represents a grand challenge (Micheau et al., 2013). What creates even more confusion is that selective engagement of either TRAIL-R1 or TRAIL-R2 occurs in diverse cancer types (MacFarlane et al., 2005; Natoni et al., 2007; Surget et al., 2012). Moreover, the expression of TRAIL receptors is not known in a significant proportion of malignancies and since it has been already demonstrated that the TRAIL-Rs expression differs among different cancers, it might be presumed that the expression can also vary among individuals with the same cancer type (Min et al., 2004; McCarthy et al., 2005).

In spite of the promising preclinical observations, the TRAIL-based therapies in humans have certain limitations. The TRAIL-

R's agonistic antibodies seem to rather elicit a limited agonistic potential, and only a few drugs have entered the phase II clinical trials. The main reason for the clinical failure of the first generation of antibodies was their weak ability to induce the receptor aggregation which is necessary for triggering the downstream apoptotic pathway (Dubuisson and Micheau, 2017). Multivalent antibodies seemed to overcome this challenge. However, these antibodies also elicited many adverse events (Liu et al., 2015; Papadopoulos et al., 2015). So far, satisfactory results with agonistic antibodies were attained in follicular non-Hodgkin's lymphoma, where the stability of the disease was achieved in 30% of the patients receiving mapatumumab (Younes et al., 2010).

The antitumor activity of soluble TRAIL agents was mostly seen in the treatment of NSCLC, where the recombinant protein dulanermin has reached clinical phase III (Ouyang et al., 2018). It is presumed that the favorable safety profile of dulanermin along with its so far limited potency to improve the OS will promote further studies of this agent in different settings and therapeutic combinations (Ouyang et al., 2018). Interestingly, it has been demonstrated that concomitant administration of chemotherapy and recombinant TRAIL may restore sensitivity to TRAIL-induced apoptosis in primary TRAIL-resistant tumor cells (Micheau et al., 2013).

Therefore, to understand mechanisms that drive the expression of TRAIL-Rs, the extensive analysis of the expression status prior- and post- chemotherapy/targeted therapy/immunotherapy should be conducted.

The so-far modest efficacy of the TRAIL-agonistic antibodies and recombinant TRAIL, the therapies could still show unexpected efficacy upon combining with other treatment approaches that promise to condition the cancer cells to the TRAIL-induced apoptosis.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MS, KH, JV, AO and ZS contributed to the conceptualization, data analysis and review of the literature. MS and ZS wrote and designed the manuscript. RL, JB and DS supervised the project and raised valuable comments. All authors have reviewed the final version of the manuscript.

REFERENCES

- Aboulnasr, F., Krogman, A., Graham, R. P., Cummins, N. W., Misra, A., Garcia-Rivera, E., et al. (2020). Human cancers express TRAILshort, a dominant negative TRAIL splice variant, which impairs immune effector cell killing of tumor cells. *Clin. Cancer Res.* 26 (21), 5759–5771. doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-0251
- Calvo, E., de Jonge, M. J. A., Rasco, D. W., Moreno, V., Chang, Y.-W., Chiney, M., et al. (2019). First-in-human study of ABBV-621 in patients (pts) with previously treated solid tumours: dose-optimization cohorts. *Ann. Oncol.* 30, v169–v170. doi:10.1093/annonc/mdz244.019
- Cheah, C. Y., Belada, D., Fanale, M. A., Janikova, A., Czucman, M. S., Flinn, I. W., et al. (2015). Dulanermin with rituximab in patients with relapsed indolent B-cell lymphoma: an open-label phase 1b/2 randomised study. *Lancet Haematol.* 2 (4), e166–e174. doi:10.1016/S2352-3026(15)00026-5
- Chen, W., Qiu, L., Hou, J., Zhao, Y., Pan, L., Yang, S., et al. (2012). Recombinant circularly permuted TRAIL (CPT) for the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma: an open-label, multicenter phase II clinical trial. *Blood.* 120 (21), 78. doi:10.1182/blood.v120.21.78.78
- Chuntharapai, A., Dodge, K., Grimmer, K., Schroeder, K., Marsters, S. A., Koeppen, H., et al. (2001). Isotype-dependent inhibition of tumor growth *in vivo* by monoclonal antibodies to death receptor 4. *J. Immunol.* 166 (8), 4891–4898. doi:10.4049/jimmunol.166.8.4891
- Cohn, A. L., Tabernero, J., Maurel, J., Nowara, E., Sastre, J., and Chuah, B. Y. S. (2013). A randomized, placebo-controlled phase 2 study of ganitumab or conatumumab in combination with FOLFIRI for second-line treatment of mutant metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 24 (7), 1777–1785. doi:10.1093/annonc/mdt057
- Dai, X., Zhang, J., Arfuso, F., Chinnathambi, A., Zayed, M. E., Alharbi, S. A., et al. (2015). Targeting TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor by

- natural products as a potential therapeutic approach for cancer therapy. *Exp. Biol. Med.* 240 (6), 760–773. doi:10.1177/1535370215579167
- de Miguel, D., Lemke, J., Anel, A., Walczak, H., and Martinez-Lostao, L. (2016). Onto better TRAILs for cancer treatment. *Cell Death Differ* 23 (5), 733–747. doi:10.1038/cdd.2015.174
- Dobson, C. L., Main, S., Newton, P., Chodorge, M., Cadwallader, K., Humphreys, R., et al. (2009). Human monomeric antibody fragments to TRAIL-R1 and TRAIL-R2 that display potent *in vitro* agonism. *mAbs*. 1 (6), 552–562. doi:10.4161/mabs.1.6.10057
- Dubuisson, A., and Micheau, O. (2017). Antibodies and derivatives targeting DR4 and DR5 for cancer therapy. *Antibodies* 6 (4), 16. doi:10.3390/antib6040016
- Dufva, O., Koski, J., Maliniemi, P., Ianevski, A., Klievink, J., Leitner, J., et al. (2020). Integrated drug profiling and CRISPR screening identify essential pathways for CAR T-cell cytotoxicity. *Blood*. 135 (9), 597–609. doi:10.1182/blood.2019002121
- Ehrlich, S., Infante-Duarte, C., Seeger, B., and Zipp, F. (2003). Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes. *Cytokine*. 24 (6), 244–253. doi:10.1016/s1043-4666(03)00094-2
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35 (4), 495–516. doi:10.1080/01926230701320337
- Fang, F., Wang, A. P., and Yang, S. F. (2005). Antitumor activity of a novel recombinant mutant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Acta Pharmacol. Sin.* 26 (11), 1373–1381. doi:10.1111/j.1745-7254.2005.00206.x
- Feins, S., Kong, W., Williams, E. F., Milone, M. C., and Fraietta, J. A. (2019). An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer. *Am. J. Hematol.* 94 (S1), S3–s9. doi:10.1002/ajh.25418
- Forero-Torres, A., Infante, J. R., Waterhouse, D., Wong, L., Vickers, S., Arrowsmith, E., et al. (2013). Phase 2, multicenter, open-label study of tigatuzumab (CS-1008), a humanized monoclonal antibody targeting death receptor 5, in combination with gemcitabine in chemotherapy-naïve patients with unresectable or metastatic pancreatic cancer. *Cancer Med.* 2 (6), 925–932. doi:10.1002/cam4.137
- Fuchs, C. S., Fakih, M., Schwartzberg, L., Cohn, A. L., Yee, L., Dreisbach, L., et al. (2013). TRAIL receptor agonist conatumumab with modified FOLFOX6 plus bevacizumab for first-line treatment of metastatic colorectal cancer: a randomized phase 1b/2 trial. *Cancer* 119 (24), 4290–4298. doi:10.1002/cncr.28353
- Gasparini, C., Vecchi Brumatti, L., Monasta, L., and Zauli, G. (2013). TRAIL-based therapeutic approaches for the treatment of pediatric malignancies. *Curr. Med. Chem.* 20 (17), 2254–2271. doi:10.2174/0929867311320170009
- He, Y., Hendriks, D., van Ginkel, R., Samplonius, D., Bremer, E., and Helfrich, W. (2016). Melanoma-directed activation of apoptosis using a bispecific antibody directed at MCSP and TRAIL receptor-2/death receptor-5. *J. Invest. Dermatol.* 136 (2), 541–544. doi:10.1016/j.jid.2015.11.009
- Hendriks, D., He, Y., Koopmans, I., Wiersma, V. R., van Ginkel, R. J., Samplonius, D. F., et al. (2016). Programmed Death Ligand 1 (PD-L1)-targeted TRAIL combines PD-L1-mediated checkpoint inhibition with TRAIL-mediated apoptosis induction. *Oncoimmunology* 5 (8), e1202390. doi:10.1080/2162402X.2016.1202390
- Hirata, E., and Sahai, E. (2017). Tumor microenvironment and differential responses to therapy. *Cold Spring Harb Perspect. Med.* 7 (7), a026781. doi:10.1101/cshperspect.a026781
- Jeong, G. M., Lee, Y. J., Kim, Y. S., and Jeong, K. J. (2014). High-level production of Fc-fused kringle domain in *Pichia pastoris*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41 (6), 989–996. doi:10.1007/s10295-014-1435-2
- Kindler, H. L., Richards, D. A., Garbo, L. E., Garon, E. B., Stephenson, J. J., Jr., Rocha-Lima, C. M., et al. (2012). A randomized, placebo-controlled phase 2 study of ganitumab (AMG 479) or conatumumab (AMG 655) in combination with gemcitabine in patients with metastatic pancreatic cancer. *Ann. Oncol.* 23 (11), 2834–2842. doi:10.1093/annonc/mds142
- Kobayashi, E., Kishi, H., Ozawa, T., Hamana, H., Nakagawa, H., Jin, A., et al. (2014). A chimeric antigen receptor for TRAIL-receptor 1 induces apoptosis in various types of tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453 (4), 798–803. doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.024
- Lemke, J., von Karstedt, S., Zinngrube, J., and Walczak, H. (2014). Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death Differ* 21 (9), 1350–1364. doi:10.1038/cdd.2014.81
- Lim, B., Greer, Y., Lipkowitz, S., and Takebe, N. (2019). Novel apoptosis-inducing agents for the treatment of cancer, a new arsenal in the toolbox. *Cancers* 11 (8), 1087. doi:10.3390/cancers11081087
- Liu, F., Si, Y., Liu, G., Li, S., Zhang, J., and Ma, Y. (2015). The tetravalent anti-DR5 antibody without cross-linking direct induces apoptosis of cancer cells. *Biomed. Pharmacother.* 70, 41–45. doi:10.1016/j.biopha.2014.12.024
- Lopez, J., and Tait, S. W. (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br. J. Cancer* 112 (6), 957–962. doi:10.1038/bjc.2015.85
- MacFarlane, M., Kohlhaas, S. L., Sutcliffe, M. J., Dyer, M. J., and Cohen, G. M. (2005). TRAIL receptor-selective mutants signal to apoptosis via TRAIL-R1 in primary lymphoid malignancies. *Cancer Res.* 65 (24), 11265–11270. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2801
- McCarthy, M. M., Sznol, M., DiVito, K. A., Camp, R. L., Rimm, D. L., and Kluger, H. M. (2005). Evaluating the expression and prognostic value of TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 11 (14), 5188–5194. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0158
- Medler, J., Nelke, J., Weisenberger, D., Steinfatt, T., Rothaug, M., Berr, S., et al. (2019). TNFRSF receptor-specific antibody fusion proteins with targeting controlled FcγR-independent agonistic activity. *Cell Death Dis.* 10 (3), 224. doi:10.1038/s41419-019-1456-x
- Micheau, O., Shirley, S., and Dufour, F. (2013). Death receptors as targets in cancer. *Br. J. Pharmacol.* 169 (8), 1723–1744. doi:10.1111/bph.12238
- Mika, T., Maghnoouj, A., Klein-Scory, S., Ladigan-Badura, S., Baraniskin, A., Thomson, J., et al. (2020). Digital-droplet PCR for quantification of CD19-directed CAR T-cells. *Front. Mol. Biosci.* 7, 84. doi:10.3389/fmolb.2020.00084
- Min, Y. J., Lee, J. H., Choi, S. J., Chi, H. S., Lee, J. S., Kim, W. K., et al. (2004). Prognostic significance of Fas (CD95) and TRAIL receptors (DR4/DR5) expression in acute myelogenous leukemia. *Leuk. Res.* 28 (4), 359–365. doi:10.1016/j.leukres.2003.08.015
- Nagai, H., and Kim, Y. H. (2017). Cancer prevention from the perspective of global cancer burden patterns. *J. Thorac. Dis.* 9 (3), 448–451. doi:10.21037/jtd.2017.02.75
- Natoni, A., MacFarlane, M., Inoue, S., Walewska, R., Majid, A., Knee, D., et al. (2007). TRAIL signals to apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells primarily through TRAIL-R1 whereas cross-linked agonistic TRAIL-R2 antibodies facilitate signalling via TRAIL-R2. *Br. J. Haematol.* 139 (4), 568–577. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06852.x
- Ouyang, X., Shi, M., Jie, F., Bai, Y., Shen, P., Yu, Z., et al. (2018). Phase III study of dulanermin (recombinant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand) combined with vinorelbine and cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Invest. New Drugs.* 36 (2), 315–322. doi:10.1007/s10637-017-0536-y
- Pal, S., Amin, P. J., Sainis, K. B., and Shankar, B. S. (2016). Potential role of TRAIL in metastasis of mutant KRAS expressing lung adenocarcinoma. *Cancer Microenviron.* 9 (2-3), 77–84. doi:10.1007/s12307-016-0184-3
- Pan, L. Q., Zhao, W. B., Lai, J., Ding, D., Wei, X. Y., Li, Y. Y., et al. (2015). Hetero-modification of TRAIL trimer for improved drug delivery and *in vivo* antitumor activities. *Sci. Rep.* 5 (1), 14872. doi:10.1038/srep14872
- Papadopoulos, K. P., Isaacs, R., Bilic, S., Kentsch, K., Huet, H. A., Hofmann, M., et al. (2015). Unexpected hepatotoxicity in a phase I study of TAS266, a novel tetravalent agonistic Nanobody® targeting the DR5 receptor. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 75 (5), 887–895. doi:10.1007/s00280-015-2712-0
- Pehlivan, K. C., Duncan, B. B., and Lee, D. W. (2018). CAR-T cell therapy for acute lymphoblastic leukemia: transforming the treatment of relapsed and refractory disease. *Curr. Hematol. Malig Rep.* 13 (5), 396–406. doi:10.1007/s11899-018-0470-x
- Pieczykolan, J. S., Kubiński, K., Masłyk, M., Pawlak, S. D., Pieczykolan, A., Rózga, P. K., et al. (2014). AD-O53.2--a novel recombinant fusion protein combining the activities of TRAIL/Apo2L and Smac/Diablo, overcomes resistance of human cancer cells to TRAIL/Apo2L. *Invest. New Drugs.* 32 (6), 1155–1166. doi:10.1007/s10637-014-0153-y
- Qiu, Y., Zhang, Z., Shi, J., Liu, S., Liu, Y., and Zheng, D. (2012). A novel anti-DR5 chimeric antibody and epirubicin synergistically suppress tumor growth. *IUBMB Life.* 64 (9), 757–765. doi:10.1002/iub.1064
- Quintavalle, C., and Condorelli, G. (2012). Dulanermin in cancer therapy: still much to do. *Transl. Lung Cancer Res.* 1 (2), 158–159. doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2012.02.03
- Ratnam, M. J., Doi, T., De Jonge, M. J., LoRusso, P., Dunbar, M., Chiney, M., et al. (2019). Phase 1, first-in-human study of TRAIL receptor agonist fusion protein ABBV-621. *Jco* 37 (15), 3013. doi:10.1200/jco.2019.37.15_suppl.3013

- Reck, M., Krzakowski, M., Chmielowska, E., Sebastian, M., Hadler, D., Fox, T., et al. (2013). A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 study of tigatuzumab (CS-1008) in combination with carboplatin/paclitaxel in patients with chemotherapy-naïve metastatic/unresectable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 82 (3), 441–448. doi:10.1016/j.lungcan.2013.09.014
- Schirmacher, V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: a review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int. J. Oncol.* 54 (2), 407–419. doi:10.3892/ijo.2018.4661
- Soria, J. C., Márk, Z., Zatloukal, P., Szima, B., Albert, I., Juhász, E., et al. (2011). Randomized phase II study of dulanermin in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 29 (33), 4442–4451. doi:10.1200/JCO.2011.37.2623
- Surget, S., Chiron, D., Gomez-Bougie, P., Descamps, G., Ménoret, E., Bataille, R., et al. (2012). Cell death via DR5, but not DR4, is regulated by p53 in myeloma cells. *Cancer Res.* 72 (17), 4562–4573. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0487
- von Karstedt, S., and Walczak, H. (2020). An unexpected turn of fortune: targeting TRAIL-Rs in KRAS-driven cancer. *Cell Death Discov.* 6 (1), 14. doi:10.1038/s41420-020-0249-4
- Wajant, H. (2019). Molecular mode of action of TRAIL receptor agonists-common principles and their translational exploitation. *Cancers* 11 (7). doi:10.3390/cancers11070954
- Wajant, H. (2004). TRAIL and NFkappaB signaling--a complex relationship. *Vitam Horm.* 67, 101–132. doi:10.1016/S0083-6729(04)67007-5
- Willms, A., Schitteck, H., Rahn, S., Sosna, J., Mert, U., Adam, D., et al. (2019). Impact of p53 status on TRAIL-mediated apoptotic and non-apoptotic signaling in cancer cells. *PLoS One* 14 (4), e0214847. doi:10.1371/journal.pone.0214847
- Yang, J., Leblanc, F. R., Dighe, S., Nyland, S. B., Feith, D. J., and Loughran, T. P., Jr (2016). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) mediates and sustains NF-kb constitutive activation in LGL leukemia cells. *Blood* 128 (22), 2762. doi:10.1182/blood.v128.22.2762.2762
- Younes, A., Vose, J. M., Zelenetz, A. D., Smith, M. R., Burris, H. A., Ansell, S. M., et al. (2010). A Phase 1b/2 trial of mapatumumab in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Br. J. Cancer* 103 (12), 1783–1787. doi:10.1038/sj.bjc.6605987
- Yuan, X., Gajan, A., Chu, Q., Xiong, H., Wu, K., and Wu, G. S. (2018). Developing TRAIL/TRAIL death receptor-based cancer therapies. *Cancer Metastasis Rev.* 37 (4), 733–748. doi:10.1007/s10555-018-9728-y
- Zhang, H. Y., Man, J. H., Liang, B., Zhou, T., Wang, C. H., Li, T., et al. (2010). Tumor-targeted delivery of biologically active TRAIL protein. *Cancer Gene Ther.* 17 (5), 334–343. doi:10.1038/cgt.2009.76
- Zhang, Y., and Zhang, Z. (2020). The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell Mol. Immunol.* 17 (8), 807–821. doi:10.1038/s41423-020-0488-6

Conflict of Interest: JB is a part-time employee and a minority shareholder of SOTIO a.s., a biotech company developing cell-based immunotherapy.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Snajdauf, Havlova, Vachtenheim, Ozaniak, Lischke, Bartunkova, Smrz and Strizova. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

2.3.3 Práce s názvem „Tumoral and paratumoral NK cells and CD8⁺ T cells of esophageal carcinoma patients express high levels of CD47“

CD47 je takzvaný „don't eat me“ signál, který exprimují na svém povrchu buňky proto, aby unikly fagocytóze. Vysoká exprese CD47 molekuly na nádorových buňkách slouží jako prediktivní faktor, který předvídá správnou terapeutickou odpověď na terapii anti-CD47 monoklonální protilátkou. My jsme byli první, kteří se pokusili objasnit, zda je molekula CD47 exprimovaná v nádorovém mikroprostředí karcinomu jícnu a zda by tedy mohla být terapie anti-CD47 protilátkou využita v léčbě pokročilého karcinomu jícnu.

K našemu překvapení naše výsledky ukázaly, že nejen nádorové, ale též imunitní buňky v karcinomu jícnu exprimují vysoké množství CD47 molekuly. Dokonce byla dominantním nálezem u všech pacientů vysoká exprese CD47 právě na imunitních CD8 T a NK buňkách a tato exprese byla významně vyšší než na buňkách nádorových. Tato zjištění naznačují, že NK buňky a T buňky mohou využívat „don't eat me“ signál jako mechanismus, kterým se vyhýbají eliminaci tumor-infiltrujícími makrofágy. Naše data současně nepotvrdila, že by in vitro aplikace anti-CD47 protilátky vedla ke zvýšení aktivace imunitních buněk. Závěrem tedy lze říci, že terapie prostřednictvím anti-CD47 monoklonální protilátky není vhodná pro léčbu karcinomu jícnu, neboť bude preferenčně cílit na buňky imunitní a způsobí jejich prioritní likvidaci.

OPEN

Tumoral and paratumoral NK cells and CD8⁺ T cells of esophageal carcinoma patients express high levels of CD47

Zuzana Strizova¹, Jiri Vachtenheim Jr², Martin Snajdauf², Robert Lischke², Jirina Bartunkova¹ & Daniel Smrz¹✉

In a limited number of human malignancies, anti-CD47 therapy leads to the rapid clearance of tumor cells by macrophages. In esophageal squamous cell carcinoma, anti-CD47 treatment has shown promising results *in vitro*. However, the CD47 expression pattern in tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), which are associated with prolonged overall survival and serve as a positive prognostic factor, is largely unknown. In this study, a total of 36 tissue samples from the tumor, peritumoral tissue, and adjacent healthy esophageal tissue was obtained from 12 esophageal carcinoma (EC) patients, and the surface expression of CD47 was evaluated in natural killer (NK) cells, CD8⁺ T cells, and the nonlymphocyte cell fraction. We found that the proportions of the evaluated cells and their CD47-expressing populations were comparable across the analyzed tissue compartments. However, the proportions of CD47-expressing populations in the analyzed tissue compartments were significantly higher in NK cells and CD8⁺ T cells than in the nonlymphocyte cell fraction. Importantly, the intensity of CD47 staining was also significantly higher in the tested immune cells than in the nonlymphocyte cell fraction. High expression of CD47 in tissue-infiltrating NK cells and CD8⁺ T cells in EC patients can, therefore, affect the efficacy of anti-CD47 therapy in EC.

CD47 is a widely expressed transmembrane protein of the immunoglobulin superfamily¹. Known as a myeloid-specific immune checkpoint², CD47 has been shown to be involved in multiple T cell functions, regulating either the attenuation or enhancement of T cell responses³. CD47 interacts with several molecules such as thrombospondin 1 (TSP-1), integrins, and signal regulatory proteins γ (SIRP γ) and α (SIRP α)¹. SIRP α is predominantly expressed on macrophages, monocytes, granulocytes, and dendritic cells⁴. Its interaction with CD47 induces an inhibitory “don’t eat me” signal that prevents cells from phagocytosing CD47-expressing cells¹.

CD47 is also expressed in tumor cells in a number of human malignancies³. CD47 overexpression is associated with a poor prognosis in bladder cancer⁵, breast cancer⁶, and different types of leukemia⁷ and is considered to be a marker of cancer recurrence⁶. Since CD47 prevents the phagocytosis of tumor cells¹, CD47 antagonists have been tested in cancer immunotherapy⁸. Currently, there are several ongoing phase I clinical trials testing these antagonists for the treatment of solid and hematological malignancies^{9,10}. An anti-CD47 antibody would presumably increase tumor cell phagocytosis and antitumor CD8⁺ T cell response priming¹¹. However, the detailed mechanism underlying the treatment efficacy of anti-CD47 therapy is still unknown.

Esophageal carcinoma (EC) remains one of the most lethal human malignancies, with a 5-year survival rate of less than 15%¹². CD47 is overexpressed in the tumor tissues of esophageal squamous cell cancer (ESCC) patients^{13,14}. In combination with other molecules, CD47, therefore, represents a prognostic factor in ESCC¹⁴. *In vitro* experiments have shown that blocking CD47-SIRP α signaling with anti-CD47 antibodies increases the phagocytosis of CD47-expressing ESCC tumor cells by macrophages in a dose-dependent manner¹³. These findings indicate that anti-CD47 therapy could be an effective treatment modality for ESCC¹³.

Apart from the tumor cells, lymphocytes are present in EC tumors (TILs, tumor-infiltrating lymphocytes). In EC, increased numbers of TILs have been positively associated with a favorable prognosis^{15–17}. However, it

¹Department of Immunology, Second Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, V Uvalu 84, 150 06 Praha 5, Czech Republic. ²Third Department of Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic. ✉email: daniel.smrz@lfmotol.cuni.cz

is not known whether TILs in EC also express CD47, which would mark these cells as targets for anti-CD47 immunotherapy.

In this study, we aimed to analyze the expression of the CD47 molecule in both tumor-infiltrating lymphocytes and the nonlymphocyte cell fraction of tumoral and paratumoral tissue samples from EC patients. We evaluated 36 tissue samples of 3 different tissue compartments, the tumor, peritumoral tissue, and adjacent healthy esophageal tissue, obtained from 12 esophageal carcinoma patients. Using flow cytometry, we determined the expression of CD47 in NK cells, CD8⁺ T cells, and the nonlymphocyte cell fraction.

Results

The proportions of NK cells and CD8⁺ T cells are comparable between the tumoral and paratumoral tissue compartments. In this study, 36 tissue samples from 12 patients who underwent surgery for EC were evaluated (Table 1). The tissue samples were obtained from tumor tissue, peritumoral tissue, and adjacent healthy esophageal tissue. The tissue samples were dissociated, and the isolated cells were stained with antibodies specific to CD45, CD3, CD8, and CD56; analyzed by flow cytometry; and evaluated according to the gating strategy shown in Fig. 1A. As shown in Fig. 1B, no significant differences were found in the proportions of NK cells (CD45⁺CD3⁻CD56⁺ cells), T cells (CD45⁺CD3⁺CD8⁺ cells), or the nonlymphocyte population (CD45⁻ cells) among the analyzed tissue compartments (Fig. 1B). These data showed that compared with paratumoral tissues (peritumoral and adjacent healthy tissues), the analyzed tumors were not infiltrated with more NK cells or CD8⁺ T cells.

Tumoral and paratumoral NK cells and CD8⁺ T cells are highly positive for CD47. In the next analysis, we evaluated the proportions of CD47-expressing populations of NK cells and CD8⁺ T cells in the tested compartments. As shown in Fig. 2A (two left panels), both cell types were highly positive for CD47, and no significant differences were observed among the tested compartments. Additionally, no significant differences among the compartments were observed for the nonlymphocytes (Fig. 2A, right panel). However, the data indicated that the proportions of CD47-expressing NK cells and CD8⁺ T cells were higher than those of the corresponding nonlymphocytes. Indeed, the proportion of CD47-expressing CD8⁺ T cells in the peritumoral tissue was significantly higher than the proportion of CD47-expressing nonlymphocytes (Fig. 2B, middle panel). In the tumor and adjacent healthy tissue, significantly higher proportions of CD47-expressing cells were found for both NK cells and CD8⁺ T cells (Fig. 2B, left and right panel).

Tumoral and paratumoral NK cells and CD8⁺ T cells express more CD47 than their nonlymphocyte counterparts. The evaluated flow cytometry data indicated that apart from the differences in the proportions of CD47-expressing populations among the tested cell types, the fluorescent intensities of their CD47 staining were also different (Fig. 1A). Therefore, we compared the intensities of NK cells, CD8⁺ T cells, and nonlymphocytes in the 3 tested compartments. The data showed that the NK cells and CD8⁺ T cells in the tumor had significantly lower staining intensity for the CD47-specific antibody than their counterparts in the adjacent healthy tissue (Fig. 3A, two left panels). Comparable results were also observed for the peritumoral NK cells (Fig. 3A, left panel). Unlike the tested immune cells, the nonlymphocytes showed nonsignificant changes in CD47 staining, although the tumoral population showed a tendency toward decreased CD47 staining intensity (Fig. 3A, right panel). Significant differences were, however, found when the CD47 staining intensities were compared among the tested cell types in each individual compartment. As shown, the tumor- and adjacent tissue-infiltrating NK cells and CD8⁺ T cells exhibited significantly higher staining intensity with the CD47-specific antibody than the nonlymphocyte population (Fig. 3B, left and right panels). In the peritumoral tissue, only the CD8⁺ T cells exhibited a significantly increased staining intensity (Fig. 3B, middle panel).

NK cells stimulation is not impacted by anti-CD47 antibody. A previous report has shown that anti-CD47 antibody increased T cell-mediated cytotoxicity when incubated with the effector and target cells¹⁸. We investigated whether targeting of CD47 on NK cells with specific antibody could impact functionality of NK cells after their stimulation with the target cells and IL-2. As shown in Fig. 4, pretreatment of PBMCs with anti-CD47 antibody for 18–20 h had no impact on cytotoxicity (Fig. 4A,C) and inflammatory response (Fig. 4B,C) of NK cells. The data suggested that CD47 on the surface of NK cells does not impact the stimulation of NK cells *in vitro* once challenged with anti-CD47 antibody.

Discussion

CD47 is often overexpressed in many tumors. This molecule has therefore become a target molecule for cancer therapy. In this study, we show that in addition to tumor cells, the majority of tumoral and paratumoral NK cells and CD8⁺ T cells also express CD47, and the levels of its expression are even higher than in the parallel nonlymphocyte cells. These findings indicate that these immune cells will also be targeted upon anti-CD47 therapy.

The expression of CD47 on the cell surface is generally considered as a “don’t eat me” signal¹. Our findings showed that tumoral and paratumoral NK cells and CD8⁺ T cells of EC patients express high levels of CD47 on their surface. These findings suggest that NK cells and CD8⁺ T cells may use CD47 as the signaling molecule

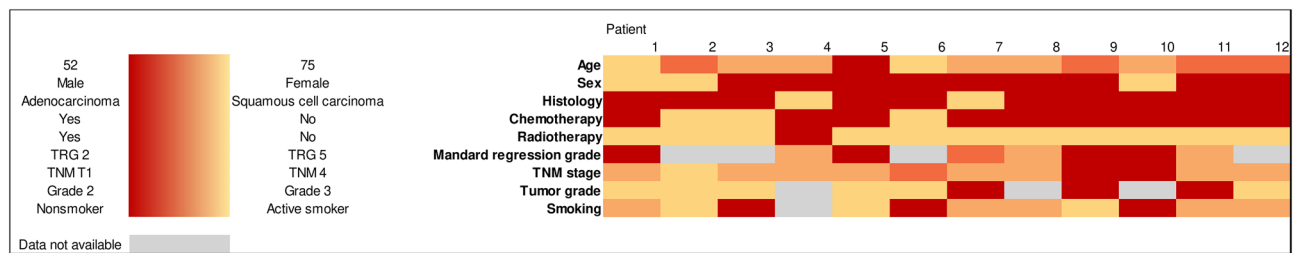


Table 1. Clinical data heat map.

to evade elimination by the infiltrating macrophages. Interestingly, CD47 expression levels on NK cells and CD8⁺ T cells were decreased in the tumor compartment. This decrease could relate to their increased cytotoxic activity^{19,20}. In vitro experiments indeed showed that forced downregulation of CD47 or its targeting by anti-CD47 antibody in CD8⁺ T cells increased their cytotoxic activity¹⁸. Our data, however, did not confirm an increase in the cytotoxic and inflammatory response of stimulated NK cells after their treatment with anti-CD47 antibody. This indicates that the antibody-mediated targeting of CD47 may not equally impact the functionality of NK cells and CD8⁺ T cells. Regardless of this, the levels of CD47 on the surface of the tested NK cells and CD8⁺ T cells were mostly higher than in the parallel nonlymphocyte cell fraction, which contains tumor cells in the tumoral compartment. This indicates that these immune cells will be relatively efficiently impacted by anti-CD47 immunotherapy.

Anti-CD47 immunotherapy relies on monoclonal antibodies that bind to CD47, which is expressed on the cell surface¹⁰. Binding of monoclonal antibodies to CD47 relieves the block that prevents the cells from being phagocytosed by macrophages²¹. Antibody binding can, however, also trigger cell apoptosis^{22,23}. Whether anti-CD47 antibodies mediate macrophage-mediated phagocytosis of the bound cells or trigger apoptosis in the bound cells depends on the type of targeted cell and the type and concentration of the antibody used^{13,21}. CD47-specific antibodies have been shown to trigger apoptosis in tumor cells^{22,23} and immune cells²⁴. Whether the use of anti-CD47 immunotherapy would also trigger apoptosis in CD47-expressing populations of tumoral and paratumoral NK cells and CD8⁺ T cells in EC patients or only alter the effector functions of these immune cells²⁵ needs to be determined. However, what can already be presumed is that anti-CD47 immunotherapy will inhibit the CD47-mediated “don’t eat me” signal^{10,13}. As such, unless these immune cells provide another “don’t eat me” signal that surpasses the impact of the antibody binding to CD47, these cells can be destined for elimination by infiltrating macrophages^{13,26}.

On the other hand, blocking CD47 can also prevent the augmentation of Fas/CD95-mediated apoptosis in TILs²⁷. This mechanism can be used by tumors to evade elimination by TILs²⁸. Whether this mechanism also comes into play in EC is not currently known. However, regardless of which of these mechanisms prevail in infiltrating NK cells and CD8⁺ T cells, anti-CD47 immunotherapy in EC will modulate the tumor immune microenvironment²⁹.

Infiltration of EC tumors with lymphocytes is associated with a better prognosis and prolonged overall survival^{15–17}. The findings of this study indicate that the administration of anti-CD47 immunotherapy can impact the tumoral and paratumoral infiltrating lymphocytes of EC patients. Whether this impact would be beneficial or detrimental to the efficacy of anti-CD47 immunotherapy in EC is difficult to predict. However, this impact needs to be taken into account when anti-CD47 immunotherapy is considered in EC.

In this study, we showed that the tumoral and paratumoral NK cells and CD8⁺ T cells of EC patients express high levels of CD47 on the cell surface. This can significantly contribute to the efficacy of anti-CD47 immunotherapy in EC.

Materials and methods

Patients and tissue samples. In this study, 36 tissue samples from 12 patients were included. The patients underwent a planned surgery between September 2018 and March 2019 at the Third Department of Surgery, First Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol in Prague. The age of the patients ranged from 52 to 75 years (mean 66.8 years). After surgery, 3 tissue samples were resected from 3 tissue compartments: the tumor, peritumoral tissue, and adjacent healthy esophageal tissue. This study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Motol in Prague (No. EK-810/18), and all patients provided signed written informed consent to participate in the study.

Cell isolation. Resected tissue samples were immediately transferred into a container with 5 ml of RPMI 1640 medium (Thermo Scientific, Waltham, MA) and immediately transported for processing. The tissues were mechanically dissociated (approximately 1 mm in diameter), and then cells isolated as described previously³⁰.

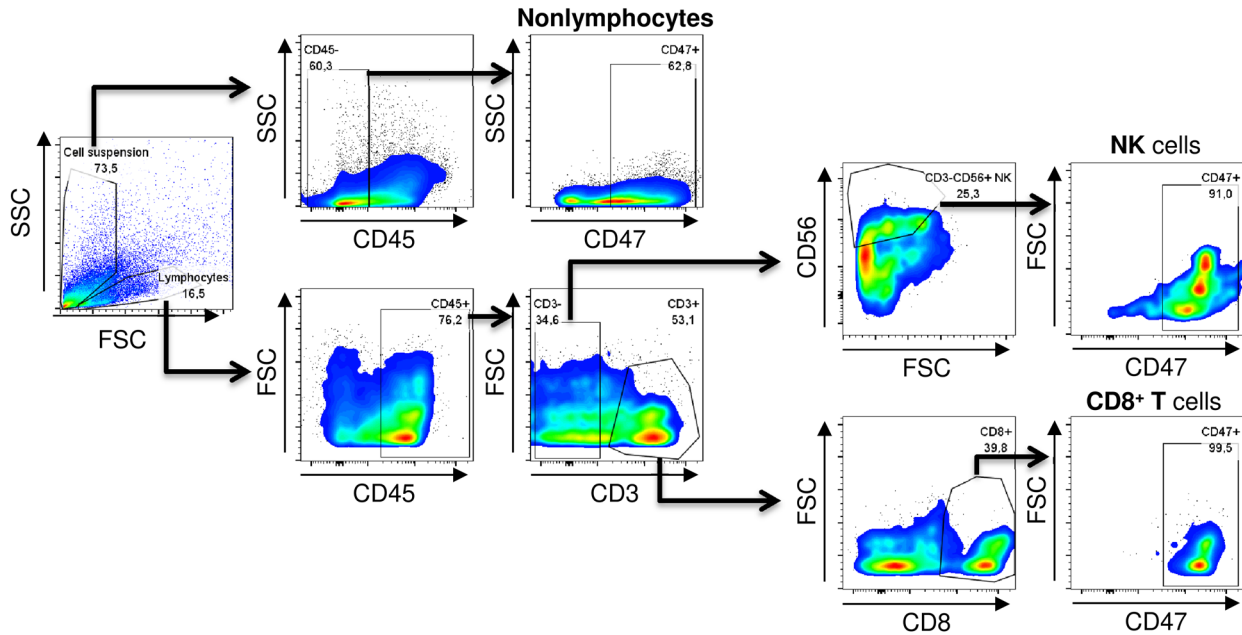
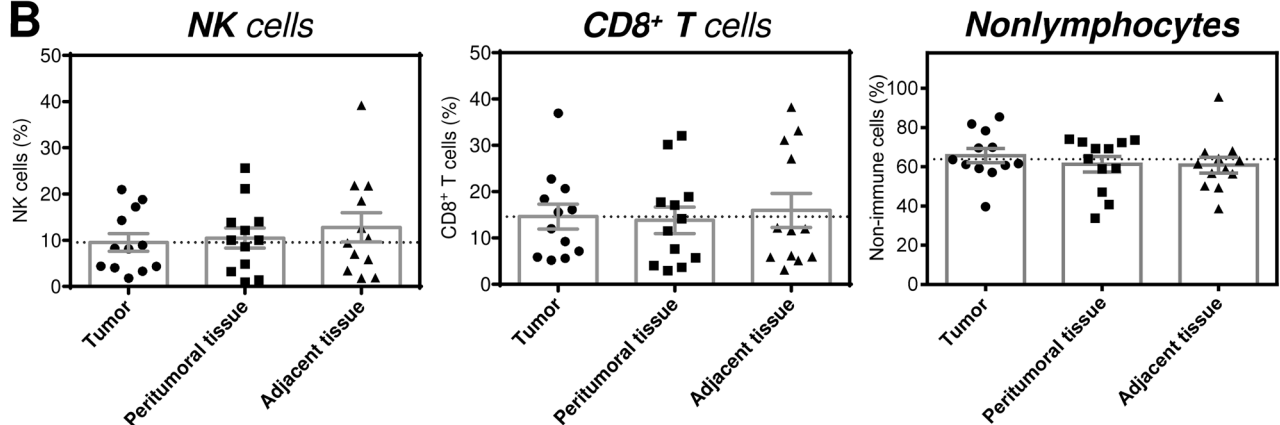
A**Gating strategy****B**

Figure 1. Proportions of NK cells, CD8⁺ T cells, and nonlymphocytes in the tumoral and paratumoral compartments of EC patients. (A) The gating strategy for flow cytometry analyses is shown. (B) The analyzed cells were gated as in (A), and the proportions of NK cells (CD45⁺CD3⁻CD56⁺), CD8⁺ T cells (CD45⁺CD3⁺CD8⁺), and nonlymphocytes (CD45⁻) in tumor tissue, peritumoral tissue, and adjacent tissue samples from 12 EC patients were determined by flow cytometry. The significance of differences was determined by nonparametric one-way ANOVA with Dunn's multiple comparison test ($n=12$). * $P<0.05$ was considered significant. The data are shown as the mean $\pm$ SEM.

Flow cytometry. Isolated cells were stained with fluorophore-conjugated antibodies as described previously³¹. The antibodies were anti-CD45 AF700 (Exbio, Prague, Czech Republic), anti-CD3 PerCP-Cy5.5 (Thermo Scientific), anti-CD56 FITC (Exbio), and anti-CD47 APC (BioLegend, San Diego, CA). The isolated cells were washed and then analyzed with a FACSaria II flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). The acquired data were analyzed by FlowJo Software (Tree Star, Ashland, OR). The gating strategy is shown in Fig. 1A.

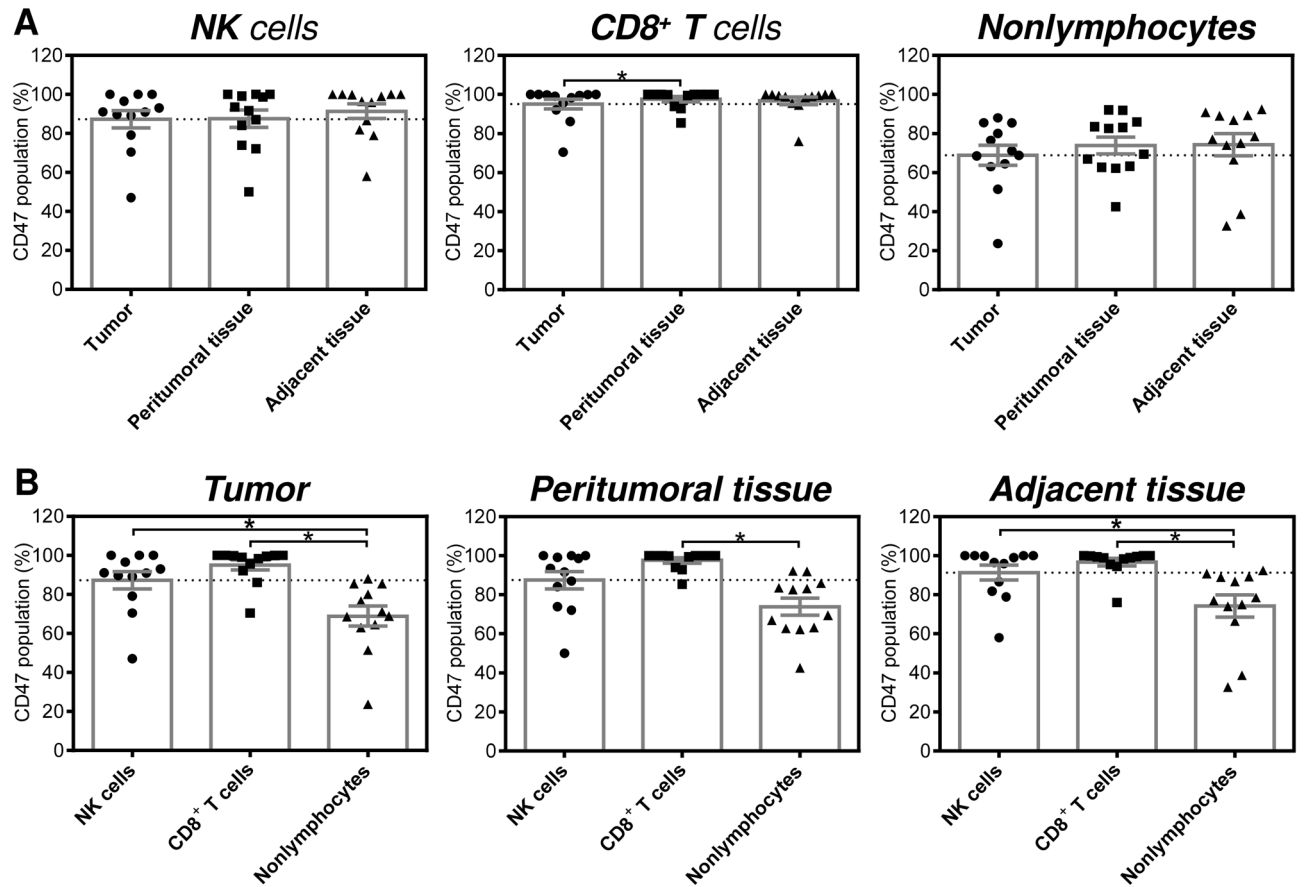


Figure 2. Proportions of CD47-expressing NK cells, CD8⁺ T cells, and nonlymphocytes in the tumoral and paratumoral compartments of EC patients. (A) The analyzed cells were gated as in Fig. 1A, and the proportions of CD47-expressing NK cells (CD45⁺CD3⁻CD56⁺CD47⁺), CD8⁺ T cells (CD45⁺CD3⁺CD8⁺CD47⁺), and nonlymphocytes (CD45⁻CD47⁺) in tumor tissue, peritumoral tissue and adjacent tissue samples from 12 EC patients were determined by flow cytometry. (B) The proportions of cells in (A) were evaluated within each tissue compartment. In (A) and (B), the significance of differences was determined by nonparametric one-way ANOVA with Dunn's multiple comparison test ($n = 12$). * $P < 0.05$ was considered significant. The data are shown as the mean $\pm$ SEM.

CD107a assay and intracellular staining of NK cells. Peripheral blood was obtained from 6 healthy volunteers (the age of the donors ranged from 31 to 44 years (mean 36.5 years)). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated as previously described³¹. The fresh-isolated cells were transferred to a culture medium [RPMI 1640 medium, 5% human plasma serum (One Lambda, Canoga Park, CA), 100 U/ml penicillin-streptomycin, 2 mM Glutamax, 1 mM sodium pyruvate and nonessential amino acid mix (Thermo Scientific)] and cultured at a concentration of 2×10^6 cells/ml in the presence or absence of CD47-specific antibody (20 μ g/ml; clone MIAP410, InVivoMab, BioXCell, Lebanon NH) for 18–20 h. The cells were harvested, pelleted, and washed twice with the culture medium. For the CD107a assay, 350×10^3 cells in 100 μ l were transferred to a 96 V-bottom well plate (Nalgene, Rochester, NY). The wells were supplemented with 100 μ l of culture medium alone or containing 35×10^3 of K-562 cells and 20,000 IU/ml of IL-2 (PeproTech, Rocky Hill, NJ). The plate was centrifuged at $30 \times g$ for 3 min at room temperature and then incubated for 2 h at 37 °C and 5% CO₂. The cells were stained as above using the anti-CD45 AF700 (Exbio), anti-CD3 PerCP-Cy5.5 (Thermo Scientific), and anti-CD56 FITC and anti-CD107a PE (Exbio) antibodies. For the intracellular staining, the cells were stimulated in a 96 U-bottom well plate (Nalgene) as above. After 1 h of stimulation (37 °C, 5% CO₂), the cells were supplemented with brefeldin A (BioLegend, San Diego, CA) and then cultured for 4.5 h. The cells were transferred to the V-bottom 96-well plate, stained with live/dead fixable stain, fixed, and permeabilized as previously described³². The cells were then stained with the anti-CD45 AF700, anti-CD3 PerCP-Cy5.5, anti-CD56 FITC, and anti-TNF α APC (Becton Dickinson) antibodies. The stained cells were analyzed by flow cytometry to determine the NK cell cytotoxic (CD107a expression³³) and inflammatory (TNF α production) response.

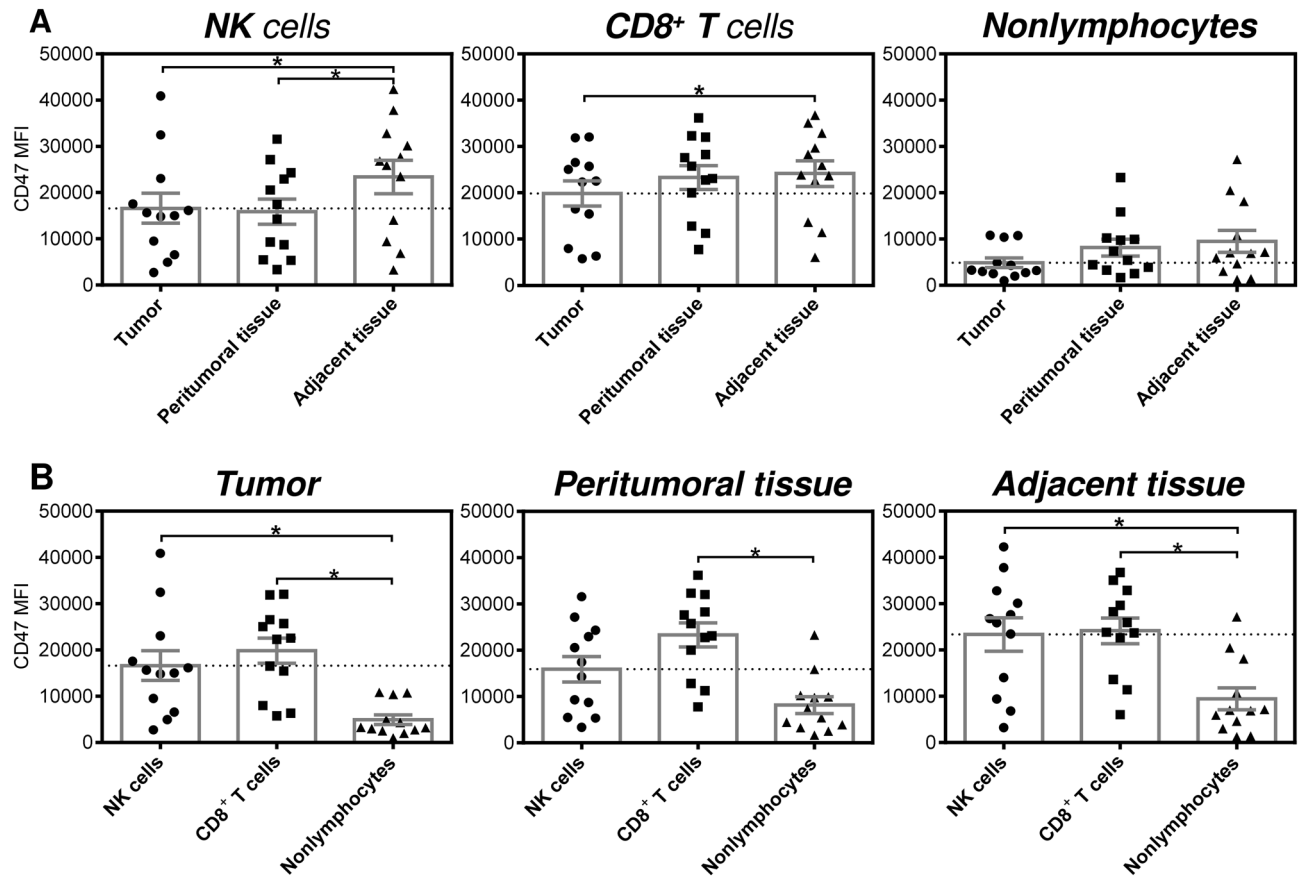


Figure 3. Intensities of CD47 staining of NK cells, CD8⁺ T cells, and nonlymphocytes in the tumoral and paratumoral compartments of EC patients. (A) The analyzed cells were gated as in Fig. 1A, and the mean fluorescence intensities of CD47 staining (CD47 MFI) of NK cells (CD45⁺CD3⁺CD56⁺), CD8⁺ T cells (CD45⁺CD3⁺CD8⁺), and nonlymphocytes (CD45⁻) in tumor tissue, peritumoral tissue and adjacent tissue samples from 12 EC patients were determined by flow cytometry. (B) The CD47 MFIs determined in (A) were evaluated within each tissue compartment. In (A) and (B), the significance of differences was determined by nonparametric one-way ANOVA with Dunn's multiple comparison test ($n = 12$). * $P < 0.05$ was considered significant. The data are shown as the mean $\pm$ SEM.

Statistical analysis. Means and SEMs were calculated from the indicated sample size (n) using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Statistical significance between three or more groups was determined by nonparametric one-way ANOVA with Dunn's multiple comparison test. Statistical significance between two groups of differentially treated samples was determined by Wilcoxon matched-pair signed-rank tests. $P < 0.05$ was considered significant.

Ethical approval. This study was approved by the ethics committee for multicentric studies and evaluation of the University Hospital Motol, Prague, Czech Republic. All procedures in the studies involving human participants were performed in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

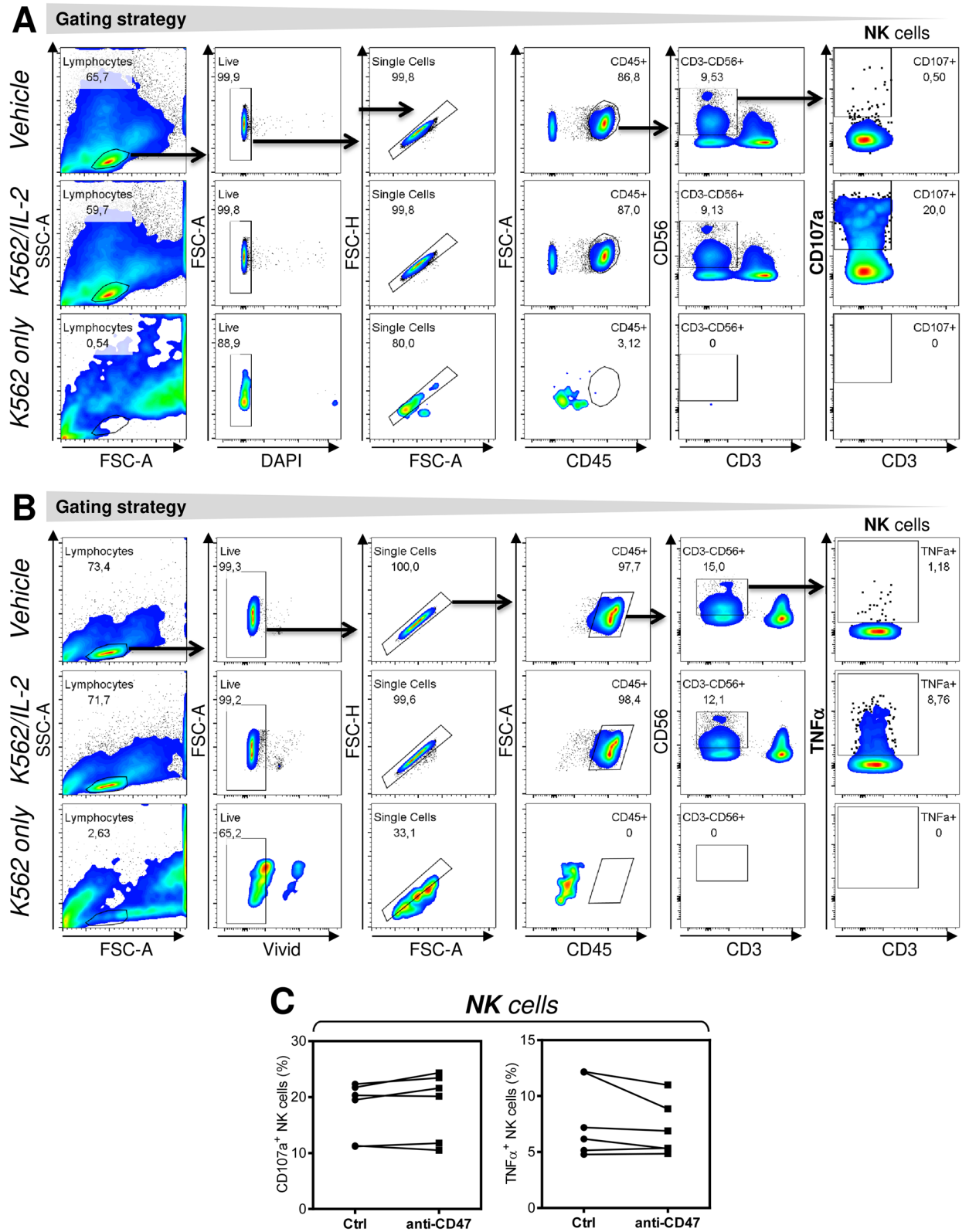


Figure 4. NK cell stimulation is not impacted by anti-CD47 antibody. (A) The gating strategy for flow cytometry analyses of CD107a externalization in NK cells (CD45⁺CD3⁻CD56⁺). PBMCs were treated or not treated with anti-CD47 antibody and stimulated with vehicle (Vehicle, top panels) or K-562 cells and IL-2 (K562/IL-2, middle panels). As a control, the target K-562 cells alone were analyzed (K562 only). (B) The gating strategy for flow cytometry analyses of TNFα intracellular staining in NK cells (CD45⁺CD3⁻CD56⁺). The samples as in (A) are shown. (C) The data in (A) and (B) were evaluated and the significance of differences determined by Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test ($n=6$ donors). * $P<0.05$ was considered significant.

References

- Barclay, A. N. & Van den Berg, T. K. The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) and CD47: structure, function, and therapeutic target. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 25–50. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120142> (2014).
- Yu, X. Y. *et al.* A novel fully human anti-CD47 antibody as a potential therapy for human neoplasms with good safety. *Biochimie* **151**, 54–66. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.05.019> (2018).
- Kong, F. *et al.* CD47: a potential immunotherapy target for eliminating cancer cells. *Clin. Transl. Oncol.* **18**(11), 1051–1055. <https://doi.org/10.1007/s12094-016-1489-x> (2016).
- Seiffert, M. *et al.* Human signal-regulatory protein is expressed on normal, but not on subsets of leukemic myeloid cells and mediates cellular adhesion involving its counterreceptor CD47. *Blood* **94**(11), 3633–3643 (1999).
- Chan, K. S. *et al.* Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**(33), 14016–14021. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906549106> (2009).
- Yuan, J. *et al.* High expression of CD47 in triple negative breast cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition and poor prognosis. *Oncol. Lett.* **18**(3), 3249–3255. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10618> (2019).
- Majeti, R. *et al.* CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* **138**(2), 286–299. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.045> (2009).
- Uger, R. & Johnson, L. Blockade of the CD47-SIRPalpha axis: a promising approach for cancer immunotherapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* **20**(1), 5–8. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1685976> (2020).
- Sikic, B. I. *et al.* First-in-human, first-in-class phase I trial of the anti-CD47 antibody Hu5F9-G4 in patients with advanced cancers. *J. Clin. Oncol.* **37**(12), 946–953. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.02018> (2019).
- Russ, A. *et al.* Blocking “don’t eat me” signal of CD47-SIRPalpha in hematological malignancies, an in-depth review. *Blood Rev.* **32**(6), 480–489. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.04.005> (2018).
- Tseng, D. *et al.* Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**(27), 11103–11108. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305569110> (2013).
- Short, M. W., Burgers, K. G. & Fry, V. T. Esophageal cancer. *Am. Fam. Physician* **95**(1), 22–28 (2017).
- Zhao, C. L. *et al.* Characterization of cluster of differentiation 47 expression and its potential as a therapeutic target in esophageal squamous cell cancer. *Oncol. Lett.* **15**(2), 2017–2023. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7447> (2018).
- Wang, J. H. *et al.* Combined prognostic value of the cancer stem cell markers CD47 and CD133 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* **8**(3), 1315–1325. <https://doi.org/10.1002/cam4.1894> (2019).
- Sudo, T. *et al.* Clinical impact of tumor-infiltrating lymphocytes in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* **24**(12), 3763–3770. <https://doi.org/10.1245/s10434-017-5796-4> (2017).
- Zheng, X. *et al.* Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in esophagus cancer: a meta-analysis. *Cell. Physiol. Biochem.* **45**(2), 720–732. <https://doi.org/10.1159/000487164> (2018).
- Badalamenti, G. *et al.* Role of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with solid tumors: can a drop dig a stone?. *Cell. Immunol.* **343**, 103753. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.013> (2019).
- Soto-Pantoja, D. R. *et al.* CD47 in the tumor microenvironment limits cooperation between antitumor T-cell immunity and radiotherapy. *Cancer Res.* **74**(23), 6771–6783. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0037-T> (2014).
- Kim, M. J. *et al.* Association of CD47 with natural killer cell-mediated cytotoxicity of head-and-neck squamous cell carcinoma lines. *Tumour Biol.* **29**(1), 28–34. <https://doi.org/10.1159/000132568> (2008).
- Schwartz, A. L. *et al.* Antisense targeting of CD47 enhances human cytotoxic T-cell activity and increases survival of mice bearing B16 melanoma when combined with anti-CTLA4 and tumor irradiation. *Cancer Immunol.* **68**(11), 1805–1817. <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02397-7> (2019).
- Metayer, L. E., Vilalta, A., Burke, G. A. A. & Brown, G. C. Anti-CD47 antibodies induce phagocytosis of live, malignant B cells by macrophages via the Fc domain, resulting in cell death by phagoptosis. *Oncotarget* **8**(37), 60892–60903. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18492> (2017).
- Leclair, P. *et al.* CD47-ligation induced cell death in T-acute lymphoblastic leukemia. *Cell Death Dis.* **9**(5), 544. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0601-2> (2018).
- Yoshida, K. *et al.* CD47 is an adverse prognostic factor and a therapeutic target in gastric cancer. *Cancer Med.* **4**(9), 1322–1333. <https://doi.org/10.1002/cam4.478> (2015).
- Johansson, U., Higginbottom, K. & Londei, M. CD47 ligation induces a rapid caspase-independent apoptosis-like cell death in human monocytes and dendritic cells. *Scand. J. Immunol.* **59**(1), 40–49. <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01355.x> (2004).
- Nath, P. R. *et al.* Natural killer cell recruitment and activation are regulated by CD47 expression in the tumor microenvironment. *Cancer Immunol. Res.* **7**(9), 1547–1561. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0367> (2019).
- Gu, S. *et al.* CD47 blockade inhibits tumor progression through promoting phagocytosis of tumor cells by M2 polarized macrophages in endometrial cancer. *J. Immunol. Res.* **2018**, 6156757. <https://doi.org/10.1155/2018/6156757> (2018).
- Manna, P. P., Dimitry, J., Oldenborg, P. A. & Frazier, W. A. CD47 augments Fas/CD95-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **280**(33), 29637–29644. <https://doi.org/10.1074/jbc.M50092200> (2005).
- Zhu, J. *et al.* Resistance to cancer immunotherapy mediated by apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes. *Nat. Commun.* **8**(1), 1404. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00784-1> (2017).
- Binniewes, M. *et al.* Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat. Med.* **24**(5), 541–550. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0014-x> (2018).
- Strizova, Z. *et al.* NK and T cells with a cytotoxic/migratory phenotype accumulate in peritumoral tissue of patients with clear cell renal carcinoma. *Urol. Oncol.* **37**(7), 503–509. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2019.03.014> (2019).
- Taborska, P., Bartunkova, J. & Smrz, D. Simultaneous in vitro generation of human CD34(+) -derived dendritic cells and mast cells from non-mobilized peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol. Methods* **458**, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.04.005> (2018).
- Stakheev, D. *et al.* The WNT/beta-catenin signaling inhibitor XAV939 enhances the elimination of LNCaP and PC-3 prostate cancer cells by prostate cancer patient lymphocytes in vitro. *Sci. Rep.* **9**(1), 4761. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41182-5> (2019).
- Aktas, E., Kucuksezer, U. C., Bilgic, S., Erten, G. & Deniz, G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell. Immunol.* **254**(2), 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2008.08.007> (2009).

Acknowledgements

We thank the clinical research staff, professional laboratory staff and technicians for their assistance and Michal Rataj for assistance with the flow cytometry experiments. We also thank Prof. Ilja Striz for his critical review of the manuscript. Research in the authors’ laboratories was supported by funding from the Charles University—project GA UK No. 364218, PRIMUS/MED/12; the Ministry of Health, Czech Republic—project AZV

16-28135A; and the conceptual development fund of research organization University Hospital Motol, Prague, Czech Republic 00064203.

Author contributions

Z.S. and D.S. conducted the experiments, performed the data acquisition and analysis. Z.S. and J.V. managed and analyzed patients' medical records and clinical data. J.V., M.S., and R.L. performed surgery and supervised the project continuity. J.B. supervised the clinical data. D.S. analyzed the data and with Z.S. wrote the manuscript. All of the authors contributed to the manuscript writing and reviewed the manuscript.

Competing interests

J. Bartunkova is a part-time employee and a minority shareholder of Sotio, a.s., a biotech company developing a cell-based immunotherapy. Z. Strizova, J. Vachtenheim Jr, M. Snajdauf, R. Lischke, and D. Smrz declare that they have no conflicts of interest.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to D.S.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

2.4 Závěr

Naše práce přispěla k zásadnímu posunu v chápání nádorového mikroprostředí karcinomu jícnu a jeho roli v prognóze pacienta. Pomocí detailního mapování charakteristik imunitních buněk v karcinomu jícnu se nám podařilo ukázat na rozdíly v imunitních infiltrátech, které se nacházejí v jednotlivých tkáňových kompartmentech v těsné blízkosti nádoru. Jedním z našich nejdůležitějších zjištění bylo, že aktivní kuřáci mají významně snížené počty infiltrujících CD8 T a NK buněk v paratumorálních tkáních, což v konečném důsledku může negativně ovlivnit prognózu pacientů s karcinomem jícnu. Dále se nám podařilo demonstrovat, že chemoterapie zásadně mění imunitní infiltráty v nádorovém mikroprostředí, a diskutovali jsme tedy její potenciál v navození citlivosti nádorů k účinkům imunoterapie prostřednictvím checkpoint inhibitorů. V neposlední řadě jsme v našich studiích hodnotili význam anti-CD47 terapie u karcinomu jícnu a potenciál klinických studií zaměřených na molekulu TRAIL.

Použitá literatura

Abnet, Christian C et al. "Epidemiology of Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *Gastroenterology* vol. 154,2 (2018): 360-373.

Ai, Dashan et al. "Patterns of distant organ metastases in esophageal cancer: a population-based study." *Journal of thoracic disease* vol. 9,9 (2017): 3023-3030.

Al-Batran, Salah-Eddin et al. "Effect of Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Surgical Resection on Survival in Patients With Limited Metastatic Gastric or Gastroesophageal Junction Cancer: The AIO-FLOT3 Trial." *JAMA oncology* vol. 3,9 (2017): 1237-1244.

Al-Batran, Salah-Eddin et al. "Perioperative chemotherapy with fluorouracil plus leucovorin, oxaliplatin, and docetaxel versus fluorouracil or capecitabine plus cisplatin and epirubicin for locally advanced, resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4): a randomised, phase 2/3 trial." *Lancet (London, England)* vol. 393,10184 (2019): 1948-1957.

Al-Batran, Salah-Eddin et al. "The RENAISSANCE (AIO-FLOT5) trial: effect of chemotherapy alone vs. chemotherapy followed by surgical resection on survival and quality of life in patients with limited-metastatic adenocarcinoma of the stomach or esophagogastric junction - a phase III trial of the German AIO/CAO-V/CAOGI." *BMC cancer* vol. 17,1 893. 28 Dec. 2017.

al-Sarraf, M et al. "Progress report of combined chemoradiotherapy versus radiotherapy alone in patients with esophageal cancer: an intergroup study." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 15,1 (1997): 277-84.

Alderson, Derek et al. "Neoadjuvant cisplatin and fluorouracil versus epirubicin, cisplatin, and capecitabine followed by resection in patients with oesophageal adenocarcinoma (UK MRC OE05): an open-label, randomised phase 3 trial." *The Lancet. Oncology* vol. 18,9 (2017): 1249-1260.

Allum, William H et al. "Long-term results of a randomized trial of surgery with or without preoperative chemotherapy in esophageal cancer." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 27,30 (2009): 5062-7.

Amin, Rajan N et al. "Early Esophageal Cancer Specific Survival Is Unaffected by Anatomical Location of Tumor: A Population-Based Study." *Canadian journal of gastroenterology & hepatology* vol. 2016 (2016): 6132640.

Amorino, G P et al. "Radiopotential by the oral platinum agent, JM216: role of repair inhibition." *International journal of radiation oncology, biology, physics* vol. 44,2 (1999): 399-405.

Ando, Nobutoshi et al. "A randomized trial comparing postoperative adjuvant chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil versus preoperative chemotherapy for localized advanced

squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus (JCOG9907).” *Annals of surgical oncology* vol. 19,1 (2012)

Athauda, Avani et al. “Impact of sex and age on chemotherapy efficacy, toxicity and survival in localised oesophagogastric cancer: A pooled analysis of 3265 individual patient data from four large randomised trials (OE02, OE05, MAGIC and ST03).” *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* vol. 137 (2020): 45-56.

Bang, Yung-Jue et al. “Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial.” *Lancet (London, England)* vol. 376,9742 (2010): 687-97.

Bedenne, Laurent et al. “Chemoradiation followed by surgery compared with chemoradiation alone in squamous cancer of the esophagus: FFCD 9102.” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 25,10 (2007): 1160-8.

Berrisford, Richard G et al. “Laparoscopic ischaemic conditioning of the stomach may reduce gastric-conduit morbidity following total minimally invasive oesophagectomy.” *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* vol. 36,5 (2009).

Biere, Surya S A Y et al. “Minimally invasive versus open oesophagectomy for patients with oesophageal cancer: a multicentre, open-label, randomised controlled trial.” *Lancet (London, England)* vol. 379,9829 (2012): 1887-92.

Bollschweiler, E et al. “Demographic variations in the rising incidence of esophageal adenocarcinoma in white males.” *Cancer* vol. 92,3 (2001): 549-55.

Booka, E et al. “Meta-analysis of the impact of postoperative complications on survival after oesophagectomy for cancer.” *BJs open* vol. 2,5 276-284. 19 Apr. 2018.

Bosetti, Cristina et al. “Smoking cessation and the risk of oesophageal cancer: An overview of published studies.” *Oral oncology* vol. 42,10 (2006): 957-64.

Bosset, J F et al. “Chemoradiotherapy followed by surgery compared with surgery alone in squamous-cell cancer of the esophagus.” *The New England journal of medicine* vol. 337,3 (1997): 161-7.

Burmeister, Bryan H et al. “Surgery alone versus chemoradiotherapy followed by surgery for resectable cancer of the oesophagus: a randomised controlled phase III trial.” *The Lancet. Oncology* vol. 6,9 (2005): 659-68.

Cats, Annemieke et al. “Chemotherapy versus chemoradiotherapy after surgery and preoperative chemotherapy for resectable gastric cancer (CRITICS): an international, open-label, randomised phase 3 trial.” *The Lancet. Oncology* vol. 19,5 (2018): 616-628.

Claassen, Linda et al. "Learning curve and postoperative outcomes of minimally invasive esophagectomy." *Journal of thoracic disease* vol. 11, Suppl 5 (2019)

Cook, Michael B et al. "A systematic review and meta-analysis of the risk of increasing adiposity on Barrett's esophagus." *The American journal of gastroenterology* vol. 103,2 (2008): 292-300.

Cook, Michael B et al. "Cigarette smoking and adenocarcinomas of the esophagus and esophagogastric junction: a pooled analysis from the international BEACON consortium." *Journal of the National Cancer Institute* vol. 102,17 (2010): 1344-53.

Corley, Douglas A et al. "Abdominal obesity and body mass index as risk factors for Barrett's esophagus." *Gastroenterology* vol. 133,1 (2007): 34-41.

Cossentino MJ, Wong RK. Barrett's esophagus and risk of esophageal adenocarcinoma. *Semin Gastrointest Dis.* 2003;14(3):128-135.

Cunningham, David et al. "Peri-operative chemotherapy with or without bevacizumab in operable oesophagogastric adenocarcinoma (UK Medical Research Council ST03): primary analysis results of a multicentre, open-label, randomised phase 2-3 trial." *The Lancet. Oncology* vol. 18,3 (2017): 357-370.

Cunningham, David et al. "Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer." *The New England journal of medicine* vol. 355,1 (2006): 11-20

D'Journo, Xavier Benoit et al. "Risk Prediction Model of 90-Day Mortality After Esophagectomy for Cancer." *JAMA surgery* vol. 156,9 (2021).

D'Journo, Xavier Benoit. "Clinical implication of the innovations of the 8th edition of the TNM classification for esophageal and esophago-gastric cancer." *Journal of thoracic disease* vol. 10, Suppl 22 (2018): S2671-S2681.

Daiko, Hiroyuki et al. "Novel universally applicable technique for performing bilateral transcervical mediastinoscopic-assisted transhiatal laparoscopic esophagectomy: a truly minimally invasive procedure." *Surgical endoscopy* vol. 35,9 (2021).

Davidson, Michael et al. "Influence of sex on chemotherapy efficacy and toxicity in oesophagogastric cancer: A pooled analysis of four randomised trials." *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* vol. 121 (2019): 40-47.

de Groot, Eline M et al. "Robot-assisted minimally invasive thoracoscopic esophagectomy versus open esophagectomy: long-term follow-up of a randomized clinical trial." *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus* vol. 33, Supplement_2 (2020).

Desai, Madhav et al. "Efficacy and safety outcomes of multimodal endoscopic eradication therapy in Barrett's esophagus-related neoplasia: a systematic review and pooled analysis." *Gastrointestinal endoscopy* vol. 85,3 (2017): 482-495.e4.

Dindo, Daniel et al. "Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey." *Annals of surgery* vol. 240,2 (2004).

Dubecz, A et al. "Does the Incidence of Adenocarcinoma of the Esophagus and Gastric Cardia Continue to Rise in the Twenty-First Century? a SEER Database Analysis." *Journal of gastrointestinal surgery: official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 15 Nov. 2013.

Ell, Christian et al. "Curative endoscopic resection of early esophageal adenocarcinomas (Barrett's cancer)." *Gastrointestinal endoscopy* vol. 65,1 (2007).

Ferlay, J et al. "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018." *European journal of cancer* (2018).

Fuchs, H F et al. "Simple preoperative risk scale accurately predicts perioperative mortality following esophagectomy for malignancy." *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus* vol. 30,1 (2017).

Fuchs, Charles S et al. "Safety and Efficacy of Pembrolizumab Monotherapy in Patients With Previously Treated Advanced Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer: Phase 2 Clinical KEYNOTE-059 Trial." *JAMA oncology* vol. 4,5 (2018).

Fujiwara, H et al. "Perioperative outcomes of single-port mediastinoscope-assisted transhiatal esophagectomy for thoracic esophageal cancer." *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus* vol. 30,10 (2017).

Gamboa, Anthony M et al. "Treatment allocation in patients with early-stage esophageal adenocarcinoma: Prevalence and predictors of lymph node involvement." *Cancer* vol. 122,14 (2016): 2150-7.

Gammon, M D et al. "Tobacco, alcohol, and socioeconomic status and adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia." *Journal of the National Cancer Institute* vol. 89,17 (1997): 1277-84.

Gebski, Val et al. "Survival benefits from neoadjuvant chemoradiotherapy or chemotherapy in oesophageal carcinoma: a meta-analysis." *The Lancet. Oncology* vol. 8,3 (2007): 226-34.

Gergelis, Kimberly R et al. "Proton beam radiotherapy for esophagus cancer: state of the art." *Journal of thoracic disease* vol. 12,11 (2020): 7002-7010.

Ghaly, Galal et al. "Predictors of Survival After Treatment of Oligometastases After Esophagectomy." *The Annals of thoracic surgery* vol. 105,2 (2018): 357-362.

Goense, Lucas et al. "Diagnostic Performance of ¹⁸F-FDG PET and PET/CT for the Detection of Recurrent Esophageal Cancer After Treatment with Curative Intent: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* vol. 56,7 (2015): 995-1002.

Guo, Hui-Min et al. "Endoscopic submucosal dissection vs endoscopic mucosal resection for superficial esophageal cancer." *World journal of gastroenterology* vol. 20,18 (2014).

Hagens, Eliza R C et al. "Distribution of lymph node metastases in esophageal carcinoma [TIGER study]: study protocol of a multinational observational study." *BMC cancer* vol. 19,1 662. 4 Jul. 2019.

Han, Chunyao, and Yonghong Sun. "Efficacy and safety of endoscopic submucosal dissection versus endoscopic mucosal resection for superficial esophageal carcinoma: a systematic review and meta-analysis." *Diseases of the esophagus: official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus* vol. 34,4 (2021)

Hara, Hiroki et al. "Phase II feasibility study of preoperative chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and fluorouracil for esophageal squamous cell carcinoma." *Cancer science* vol. 104,11 (2013): 1455-60.

Hellman, S, and R R Weichselbaum. "Oligometastases." *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 13,1 (1995): 8-10.

Ho, Felix et al. "Induction Chemotherapy Plus Neoadjuvant Chemoradiation for Esophageal and Gastroesophageal Junction Adenocarcinoma." *Annals of surgical oncology* vol. 28,12 (2021): 7208-7218.

Hoepfner, Jens et al. "ESOPEC: prospective randomized controlled multicenter phase III trial comparing perioperative chemotherapy (FLOT protocol) to neoadjuvant chemoradiation (CROSS protocol) in patients with adenocarcinoma of the esophagus (NCT02509286)." *BMC cancer* vol. 16 503. 19 Jul. 2016.

Hofheinz RD, Haag GM, Ettrich TJ, Borchert K, Kretschmar A, Teschendorf C, et al. Perioperative trastuzumab and pertuzumab in combination with FLOT versus FLOT alone for HER2-positive resectable esophagogastric adenocarcinoma: final results of the PETRARCA multicenter randomized phase II trial of the AIO. *J Clin Oncol*. 2020;38:4502.

Homs, Marjolein Y V et al. "Quality of life after palliative treatment for oesophageal carcinoma -- a prospective comparison between stent placement and single dose brachytherapy." *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)* vol. 40,12 (2004).

Hoyo, Cathrine et al. "Body mass index in relation to oesophageal and oesophagogastric junction adenocarcinomas: a pooled analysis from the International BEACON Consortium." *International journal of epidemiology* vol. 41,6 (2012): 1706-18.

Hulshof, Maarten C C M et al. "Randomized Study on Dose Escalation in Definitive Chemoradiation for Patients With Locally Advanced Esophageal Cancer (ARTDECO Study)." *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 39,25 (2021).

Hulscher, Jan B F et al. "Extended transthoracic resection compared with limited transhiatal resection for adenocarcinoma of the esophagus." *The New England journal of medicine* vol. 347,21 (2002): 1662-9.

Chan, D S Y et al. "Systematic review and meta-analysis of the influence of circumferential resection margin involvement on survival in patients with operable oesophageal cancer." *The British journal of surgery* vol. 100,4 (2013): 456-64.

Chen, Baofu et al. "The influence of adjuvant radiation therapy after endoscopic resection on survival for early stage EC: an analysis of the surveillance epidemiology and end results (SEER) database." *Journal of thoracic disease* vol. 11,8 (2019): 3427-3434.

Chen, Yawen et al. "Consumption of hot beverages and foods and the risk of esophageal cancer: a meta-analysis of observational studies." *BMC cancer* vol. 15 449. 2 Jun. 2015.

Chow, W H et al. "The relation of gastroesophageal reflux disease and its treatment to adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia." *JAMA* vol. 274,6 (1995): 474-7.

Chung, Chen-Shuan et al. "Prevention strategies for esophageal cancer: Perspectives of the East vs. West." *Best practice & research. Clinical gastroenterology* vol. 29,6 (2015): 869-83.

Chung, Chen-Shuan et al. "Secondary prevention of esophageal squamous cell carcinoma in areas where smoking, alcohol, and betel quid chewing are prevalent." *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* vol. 109,6 (2010): 408-21.

Ichida, Hirofumi et al. "Pattern of postoperative recurrence and hepatic and/or pulmonary resection for liver and/or lung metastases from esophageal carcinoma." *World journal of surgery* vol. 37,2 (2013): 398-407.

Kageyama, Shinichi et al. "Adoptive Transfer of MAGE-A4 T-cell Receptor Gene-Transduced Lymphocytes in Patients with Recurrent Esophageal Cancer." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* vol. 21,10 (2015).

Kamarajah, Sivesh K et al. "Critical appraisal of gastric conduit ischaemic conditioning (GIC) prior to oesophagectomy: A systematic review and meta-analysis." *International journal of surgery (London, England)* vol. 77 (2020).

Kamarajah, Sivesh K et al. "Definitive Chemoradiotherapy Compared to Neoadjuvant Chemoradiotherapy With Esophagectomy for Locoregional Esophageal Cancer: National Population-based Cohort Study." *Annals of surgery* vol. 275,3 (2022): 526-533.

Karolinska UH. A study of chemoradiotherapy followed by planned surgery or by surveillance and surgery only when needed for cancer of the esophagus (NEEDS) NCT04460352. 2020. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04460352>. Accessed 20 March 2021.

Kato, Ken et al. "Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced oesophageal squamous cell carcinoma refractory or intolerant to previous chemotherapy (ATTRACTION-3): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial." *The Lancet. Oncology* vol. 20,11 (2019): 1506-1517.

Kawaguchi, Gen et al. "The effectiveness of endoscopic submucosal dissection followed by chemoradiotherapy for superficial esophageal cancer." *Radiation oncology (London, England)* vol. 10 31. 31 Jan. 2015.

Kelly, Ronan J et al. "Adjuvant Nivolumab in Resected Esophageal or Gastroesophageal Junction Cancer." *The New England journal of medicine* vol. 384,13 (2021): 1191-1203.

Kelly, Ronan J et al. "The Dynamic and Transient Immune Microenvironment in Locally Advanced Esophageal Adenocarcinoma Post Chemoradiation." *Annals of surgery* vol. 268,6 (2018): 992-999.

Klevebro, F et al. "A randomized clinical trial of neoadjuvant chemotherapy versus neoadjuvant chemoradiotherapy for cancer of the oesophagus or gastro-oesophageal junction." *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* vol. 27,4 (2016): 660-7.

Kono, Koji et al. "Multicenter, phase II clinical trial of cancer vaccination for advanced esophageal cancer with three peptides derived from novel cancer-testis antigens." *Journal of translational medicine* vol. 10 141. 9 Jul. 2012.

Koyanagi, Kazuo et al. "Progress in Multimodal Treatment for Advanced Esophageal Squamous Cell Carcinoma: Results of Multi-Institutional Trials Conducted in Japan." *Cancers* vol. 13,1 51. 27 Dec. 2020.

Kumagai, K et al. "Systematic review and meta-analysis on the significance of salvage esophagectomy for persistent or recurrent esophageal squamous cell carcinoma after definitive chemoradiotherapy." *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus* vol. 29,7 (2016): 734-739.

Künzli, H T et al. "Thoracolaparoscopic dissection of esophageal lymph nodes without esophagectomy is feasible in human cadavers and safe in a porcine survival study." *Diseases of the esophagus: official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus* vol. 29,6 (2016): 649-55.

Kuwano, Hiroyuki et al. "Guidelines for Diagnosis and Treatment of Carcinoma of the Esophagus April 2012 edited by the Japan Esophageal Society." *Esophagus : official journal of the Japan Esophageal Society* vol. 12,1 (2015).

Lagergren J, Lagergren P. Recent developments in esophageal adenocarcinoma. *CA Cancer J Clin.* 2013;63(4):232-248.

Lagergren, J et al. "Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma." *The New England journal of medicine* vol. 340,11 (1999): 825-31.

Le Roy, Bertrand et al. "Effect of prehabilitation in gastro-oesophageal adenocarcinoma: study protocol of a multicentric, randomised, control trial-the PREHAB study." *BMJ open* vol. 6,12 e012876. 7 Dec. 2016.

Leers, Jessica M et al. "The CARDIA-trial protocol: a multinational, prospective, randomized, clinical trial comparing transthoracic esophagectomy with transhiatal extended gastrectomy in adenocarcinoma of the gastroesophageal junction (GEJ) type II." *BMC cancer* vol. 20,1 781. 20 Aug. 2020.

Leong, Trevor et al. "TOPGEAR: A Randomized, Phase III Trial of Perioperative ECF Chemotherapy with or Without Preoperative Chemoradiation for Resectable Gastric Cancer: Interim Results from an International, Intergroup Trial of the AGITG, TROG, EORTC and CCTG." *Annals of surgical oncology* vol. 24,8 (2017): 2252-2258.

Liu, Jun et al. "Intake of fruit and vegetables and risk of esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis of observational studies." *International journal of cancer* vol. 133,2 (2013): 473-85.

Liu, Qi et al. "Phase 2 Study of Stereotactic Body Radiation Therapy for Patients with Oligometastatic Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *International journal of radiation oncology, biology, physics* vol. 108,3 (2020): 707-715.

Lonie, James M et al. "Understanding the immuno-biology of oesophageal adenocarcinoma: Towards improved therapeutic approaches." *Cancer treatment reviews* vol. 98 (2021).

Lorenzen, Sylvie et al. "RACE-trial: neoadjuvant radiochemotherapy versus chemotherapy for patients with locally advanced, potentially resectable adenocarcinoma of the gastroesophageal junction - a randomized phase III joint study of the AIO, ARO and DGAV." *BMC cancer* vol. 20,1 886. 15 Sep. 2020.

Low, Donald E et al. "Benchmarking Complications Associated with Esophagectomy." *Annals of surgery* vol. 269,2 (2019): 291-298.

Low, Donald E et al. "Benchmarking Complications Associated with Esophagectomy." *Annals of surgery* vol. 269,2 (2019).

Low, Donald E et al. "International Consensus on Standardization of Data Collection for Complications Associated With Esophagectomy: Esophagectomy Complications Consensus Group (ECCG)." *Annals of surgery* vol. 262,2 (2015).

Luo, Lin-Na et al. "Endoscopic Ultrasound for Preoperative Esophageal Squamous Cell Carcinoma: a Meta-Analysis." *PloS one* vol. 11,7 e0158373. 7 Jul. 2016.

Ma, Guo-Wei et al. "Three-field vs two-field lymph node dissection for esophageal cancer: a meta-analysis." *World journal of gastroenterology* vol. 20,47 (2014).

Maes, Sielte et al. "Can the depth of invasion of early esophageal cancer be predicted based on endoscopic evidence?" *Minerva chirurgica* vol. 73,4 (2018): 385-393.

Mariette, Christophe et al. "Hybrid Minimally Invasive Esophagectomy for Esophageal Cancer." *The New England journal of medicine* vol. 380,2 (2019).

Markar SR, Karthikesalingam A et al. Volume-outcome relationship in surgery for esophageal malignancy: systematic review and meta-analysis 2000-2011. *J Gastrointest Surg.* 2012 May;16(5):1055-63.

Markar, S R et al. "Multimodality treatment for esophageal adenocarcinoma: multi-center propensity-score matched study." *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* vol. 28,3 (2017).

Markar, Sheraz R et al. "Assessment of the quality of surgery within randomised controlled trials for the treatment of gastro-oesophageal cancer: a systematic review." *The Lancet. Oncology* vol. 16,1 (2015).

Markar, Sheraz R et al. "Significance of Microscopically Incomplete Resection Margin After Esophagectomy for Esophageal Cancer." *Annals of surgery* vol. 263,4 (2016): 712-8.

Mertens, Alexander C et al. "Transthoracic Versus Transhiatal Esophagectomy for Esophageal Cancer: A Nationwide Propensity Score-Matched Cohort Analysis." *Annals of surgical oncology* vol. 28,1 (2021): 175-183.

Minashi, Keiko et al. "Efficacy of Endoscopic Resection and Selective Chemoradiotherapy for Stage I Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *Gastroenterology* vol. 157,2 (2019): 382-390.e3.

Mota, F C et al. "Neoadjuvant therapy or upfront surgery? A systematic review and meta-analysis of T2N0 esophageal cancer treatment options." *International journal of surgery (London, England)* vol. 54, Pt A (2018).

Mukherjee, Somnath et al. "Oxaliplatin/capecitabine or carboplatin/paclitaxel-based preoperative chemoradiation for resectable oesophageal adenocarcinoma (NeoSCOPE): Long-term results of a randomised controlled trial." *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* vol. 153 (2021): 153-161.

Müller, Philip C et al. "Pre-Emptive Endoluminal Negative Pressure Therapy at the Anastomotic Site in Minimally Invasive Transthoracic Esophagectomy (the preSPONGE Trial):

Study Protocol for a Multicenter Randomized Controlled Trial." *International journal of surgery protocols* vol. 25,1 7-15. 18 Mar. 2021.

Müller, Philip C et al. "Preemptive Endoluminal Vacuum Therapy to Reduce Morbidity After Minimally Invasive Ivor Lewis Esophagectomy: Including a Novel Grading System for Postoperative Endoscopic Assessment of GI-Anastomoses." *Annals of surgery* vol. 274,5 (2021).

Noordman, B J et al. "Patients' preferences for treatment after neoadjuvant chemoradiotherapy for oesophageal cancer." *The British journal of surgery* vol. 105,12 (2018): 1630-1638.

Noordman, Bo Jan et al. "Detection of residual disease after neoadjuvant chemoradiotherapy for oesophageal cancer (preSANO): a prospective multicentre, diagnostic cohort study." *The Lancet. Oncology* vol. 19,7 (2018): 965-974.

Noordman, Bo Jan et al. "Neoadjuvant chemoradiotherapy plus surgery versus active surveillance for oesophageal cancer: a stepped-wedge cluster randomised trial." *BMC cancer* vol. 18,1 142. 6 Feb. 2018.

Okoro, Ngozi I et al. "Safety of prior endoscopic mucosal resection in patients receiving radiofrequency ablation of Barrett's esophagus." *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* vol. 10,2 (2012): 150-4.

Omloo, Jikke M T et al. "Extended transthoracic resection compared with limited transhiatal resection for adenocarcinoma of the mid/distal esophagus: five-year survival of a randomized clinical trial." *Annals of surgery* vol. 246,6 (2007).

Overwater, Anouk et al. "Feasibility of sentinel node navigated surgery in high-risk T1b esophageal adenocarcinoma patients using a hybrid tracer of technetium-99 m and indocyanine green." *Surgical endoscopy* vol. 36,4 (2022): 2671-2679.

Palucka, A Karolina, and Lisa M Coussens. "The Basis of Oncoimmunology." *Cell* vol. 164,6 (2016): 1233-1247.

Paraf, F et al. "Surgical pathology of adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus. Analysis of 67 cases." *The American journal of surgical pathology* vol. 19,2 (1995): 183-91.

Park, Seong Yong et al. "The feasibility and safety of radical esophagectomy in patients receiving neoadjuvant chemoradiotherapy with pembrolizumab for esophageal squamous cell carcinoma." *Journal of thoracic disease* vol. 12,11 (2020): 6426-6434.

Patel, Krashna et al. "Completely Minimally Invasive Esophagectomy Versus Hybrid Esophagectomy for Esophageal and Gastroesophageal Junctional Cancer: Clinical and Short-Term Oncological Outcomes." *Annals of surgical oncology* vol. 28,2 (2021).

Pech, Oliver, and Saleh A Alqahtani. "Just because you can (and radiotherapy seems to be effective), doesn't mean you should." *Endoscopy* vol. 52,12 (2020): 1075-1076.

Prabhu, Anoop et al. "The synergistic effects of alcohol and tobacco consumption on the risk of esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis." *The American journal of gastroenterology* vol. 109,6 (2014): 822-7.

Qu, Xudong et al. "Consumption of red and processed meat and risk for esophageal squamous cell carcinoma based on a meta-analysis." *Annals of epidemiology* vol. 23,12 (2013): 762-770.e1.

Reynolds J V. et al. Neo-AEGIS (Neoadjuvant trial in Adenocarcinoma of the Esophagus and Esophago-Gastric Junction International Study): Preliminary results of phase III RCT of CROSS versus perioperative chemotherapy (Modified MAGIC or FLOT protocol). (NCT01726452). *Journal of Clinical Oncology* 2021 39:15_suppl, 4004-4004.

Reynolds, J V et al. "ICORG 10-14: NEOadjuvant trial in Adenocarcinoma of the oEsophagus and oesophagoGastric junction International Study (Neo-AEGIS)." *BMC cancer* vol. 17,1 401. 3 Jun. 2017.

Rizk, Nabil P et al. "Optimum lymphadenectomy for esophageal cancer." *Annals of surgery* vol. 251,1 (2010): 46-50.

Rosenbaum, Matthew W, and Raul S Gonzalez. "Targeted therapy for upper gastrointestinal tract cancer: current and future prospects." *Histopathology* vol. 78,1 (2021): 148-161.

Shapiro, Joel et al. "Neoadjuvant chemoradiotherapy plus surgery versus surgery alone for oesophageal or junctional cancer (CROSS): long-term results of a randomised controlled trial." *The Lancet. Oncology* vol. 16,9 (2015): 1090-1098.

Shapiro, Joel et al. "Neoadjuvant chemoradiotherapy plus surgery versus surgery alone for oesophageal or junctional cancer (CROSS): long-term results of a randomised controlled trial." *The Lancet. Oncology* vol. 16,9 (2015): 1090-1098.

Siewert, J R, and H J Stein. "Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction." *The British journal of surgery* vol. 85,11 (1998): 1457-9.

Sjoquist, Katrin M et al. "Survival after neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy for resectable oesophageal carcinoma: an updated meta-analysis." *The Lancet. Oncology* vol. 12,7 (2011): 681-92.

Slooter, Maxime D et al. "Fluorescent imaging using indocyanine green during esophagectomy to prevent surgical morbidity: a systematic review and meta-analysis." *Journal of thoracic disease* vol. 11, Suppl 5 (2019).

Stahl, Michael et al. "Chemoradiation with and without surgery in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the esophagus." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 23,10 (2005): 2310-7.

Stahl, Michael et al. "Preoperative chemotherapy versus chemoradiotherapy in locally advanced adenocarcinomas of the oesophagogastric junction (POET): Long-term results of a controlled randomised trial." *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* vol. 81 (2017): 183-190.

Straatman, Jennifer et al. "Minimally Invasive Versus Open Esophageal Resection: Three-year Follow-up of the Previously Reported Randomized Controlled Trial: the TIME Trial." *Annals of surgery* vol. 266,2 (2017).

Sun, Fenghao et al. "Efficacy and complication of endoscopic submucosal dissection for superficial esophageal carcinoma: a systematic review and meta-analysis." *Journal of cardiothoracic surgery* vol. 9 78. 7 May. 2014.

Sung, Hyuna et al. "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: a cancer journal for clinicians* vol. 71,3 (2021).

Tagkalos, E et al. "Robot-assisted minimally invasive esophagectomy (RAMIE) compared to conventional minimally invasive esophagectomy (MIE) for esophageal cancer: a propensity-matched analysis." *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus* vol. 33,4 (2020).

Tagkalos, E et al. "Robot-assisted minimally invasive thoraco-laparoscopic esophagectomy versus minimally invasive esophagectomy for resectable esophageal adenocarcinoma, a randomized controlled trial (ROBOT-2 trial)." *BMC cancer* vol. 21,1 1060. 26 Sep. 2021.

Takahashi, Caitlin et al. "Comparative outcomes of transthoracic versus transhiatal esophagectomy." *Surgery* vol. 170,1 (2021): 263-270.

Takeuchi, Masashi et al. "The Benefits of Docetaxel Plus Cisplatin and 5-Fluorouracil Induction Therapy in Conversion to Curative Treatment for Locally Advanced Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *World journal of surgery* vol. 43,8 (2019): 2006-2015.

Tanaka, Tsuyoshi et al. "Comparison of long-term outcomes between esophagectomy and chemoradiotherapy after endoscopic resection of submucosal esophageal squamous cell carcinoma." *Diseases of the esophagus: official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus* vol. 32,12 (2019): doz023.

Terada, Mitsumi et al. "Phase III study of tri-modality combination therapy with induction docetaxel plus cisplatin and 5-fluorouracil versus definitive chemoradiotherapy for locally advanced unresectable squamous-cell carcinoma of the thoracic esophagus (JCOG1510: TRIANGLE)." *Japanese journal of clinical oncology* vol. 49,11 (2019): 1055-1060.

Then, Eric Omar et al. "Esophageal Cancer: An Updated Surveillance Epidemiology and End Results Database Analysis." *World journal of oncology* vol. 11,2 (2020): 55-64.

Toh, U et al. "Locoregional cellular immunotherapy for patients with advanced esophageal cancer." *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* vol. 6,12 (2000): 4663-73.

Tomasello, Gianluca et al. "FOLFOXIRI Plus Bevacizumab as Conversion Therapy for Patients With Initially Unresectable Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Pooled Analysis." *JAMA oncology* vol. 3,7 (2017).

Topalian, Suzanne L et al. "Immunotherapy: The path to win the war on cancer?." *Cell* vol. 161,2 (2015): 185-6.

Tsou, Yung-Kuan et al. "Adjuvant therapy for pT1a-m3/pT1b esophageal squamous cell carcinoma after endoscopic resection: Esophagectomy or chemoradiotherapy? A critical review." *Critical reviews in oncology/hematology* vol. 147 (2020).

van der Schaaf, Maartje K et al. "The influence of preoperative weight loss on the postoperative course after esophageal cancer resection." *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* vol. 147,1 (2014): 490-5.

van der Sluis, Pieter C et al. "Robot-assisted Minimally Invasive Thoracoscopic Esophagectomy Versus Open Transthoracic Esophagectomy for Resectable Esophageal Cancer: A Randomized Controlled Trial." *Annals of surgery* vol. 269,4 (2019).

van Hagen, P et al. "Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer." *The New England journal of medicine* vol. 366,22 (2012): 2074-84.

van Hagen, P et al. "Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer." *The New England journal of medicine* vol. 366,22 (2012): 2074-84.

van Workum, Frans et al. "Learning Curve and Associated Morbidity of Minimally Invasive Esophagectomy: A Retrospective Multicenter Study." *Annals of surgery* vol. 269,1 (2019).

van Workum, Frans et al. "Totally minimally invasive esophagectomy versus hybrid minimally invasive esophagectomy: systematic review and meta-analysis." *Diseases of the esophagus: official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus* vol. 33,8 (2020).

Vellayappan, Balamurugan A et al. "Chemoradiotherapy versus chemoradiotherapy plus surgery for esophageal cancer." *The Cochrane database of systematic reviews* vol. 8,8 CD010511. 22 Aug. 2017.

Voeten, Daan M et al. "Overall Volume Trends in Esophageal Cancer Surgery Results From the Dutch Upper Gastrointestinal Cancer Audit." *Annals of surgery* vol. 274,3 (2021).

von Döbeln, G A et al. "Neoadjuvant chemotherapy versus neoadjuvant chemoradiotherapy for cancer of the esophagus or gastroesophageal junction: long-term results of a randomized clinical trial." *Diseases of the esophagus: official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus* vol. 32,2 (2019).

Vonlanthen, René et al. "Toward a Consensus on Centralization in Surgery." *Annals of surgery* vol. 268,5 (2018).

Waldman, Alex D et al. "A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice." *Nature reviews. Immunology* vol. 20,11 (2020): 651-668.

Waldman, Alex D et al. "A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice." *Nature reviews. Immunology* vol. 20,11 (2020): 651-668.

Walsh, T N et al. "A comparison of multimodal therapy and surgery for esophageal adenocarcinoma." *The New England journal of medicine* vol. 335,7 (1996): 462-7.

Wang, Daniel Y et al. "Fatal Toxic Effects Associated With Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-analysis." *JAMA oncology* vol. 4,12 (2018): 1721-1728.

Wang, Qiao-Li et al. "Smoking Cessation and Risk of Esophageal Cancer by Histological Type: Systematic Review and Meta-analysis." *Journal of the National Cancer Institute* vol. 109,12 (2017).

Wang, Yichun et al. "Anatomy of lymphatic drainage of the esophagus and lymph node metastasis of thoracic esophageal cancer." *Cancer management and research* vol. 10 6295-6303. 26 Nov. 2018.

Wei, Ming-Tian et al. "Transthoracic vs transhiatal surgery for cancer of the esophagogastric junction: a meta-analysis." *World journal of gastroenterology* vol. 20,29 (2014): 10183-92.

Weichselbaum, Ralph R, and Samuel Hellman. "Oligometastases revisited." *Nature reviews. Clinical oncology* vol. 8,6 (2011): 378-82.

Wijnhoven, Bas P L et al. "Neoadjuvant chemoradiotherapy for esophageal cancer: a review of meta-analyses." *World journal of surgery* vol. 33,12 (2009): 2606-14.

Wilke, Hansjochen et al. "Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial." *The Lancet. Oncology* vol. 15,11 (2014): 1224-35.

Wouters, Michel W J M et al. "The volume-outcome relation in the surgical treatment of esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis." *Cancer* vol. 118,7 (2012)

Wu, San-Gang et al. "Patterns of Distant Metastasis Between Histological Types in Esophageal Cancer." *Frontiers in oncology* vol. 8 302. 8 Aug. 2018.

Wu, San-Gang et al. "Sites of metastasis and overall survival in esophageal cancer: a population-based study." *Cancer management and research* vol. 9 781-788. 6 Dec. 2017, Yang, L X et al. "Irradiation enhances cellular uptake of carboplatin." *International journal of radiation oncology, biology, physics* vol. 33,3 (1995): 641-6.

Ychou, Marc et al. "Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 29,13 (2011): 1715-21.

Yokota, Tomoya et al. "A 3-Year Overall Survival Update From a Phase 2 Study of Chemoselection With DCF and Subsequent Conversion Surgery for Locally Advanced Unresectable Esophageal Cancer." *Annals of surgical oncology* vol. 27,2 (2020): 460-467.

Yokota, Tomoya et al. "Phase II study of chemoselection with docetaxel plus cisplatin and 5-fluorouracil induction chemotherapy and subsequent conversion surgery for locally advanced unresectable oesophageal cancer." *British journal of cancer* vol. 115,11 (2016): 1328-1334.

Yokoyama, Tetsuji et al. "Alcohol flushing, alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes, and risk for esophageal squamous cell carcinoma in Japanese men." *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* vol. 12,11 Pt 1 (2003): 1227-33.

Yoshimizu, Shoichi et al. "Long-term outcomes of combined endoscopic resection and chemoradiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma with submucosal invasion." *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* vol. 50,8 (2018): 833-838.

You, John J et al. "Clinical utility of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography in the staging of patients with potentially resectable esophageal cancer." *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* vol. 8,12 (2013): 1563-9.

Zander, Thomas, and Anna Dorothea Wagner. "(Neo)Adjuvant Treatment of Locally Advanced Esophageal and Gastroesophageal Adenocarcinoma: Special Focus on Sex Differences." *Cancers* vol. 14,4 1088. 21 Feb. 2022

Zhang Y. Epidemiology of esophageal cancer. *World J Gastroenterol*. 2013;19(34):5598-5606. Zhang, Xiaobin et al. "Accuracy of detecting residual disease after neoadjuvant chemoradiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma (preSINO trial): a prospective multicenter diagnostic cohort study." *BMC cancer* vol. 20,1 194. 6 Mar. 2020.

Zhang, Yuhang et al. "Endoscopic submucosal dissection with additional radiotherapy in the treatment of T1a esophageal squamous cell cancer: randomized controlled Trial." *Endoscopy* vol. 52,12 (2020): 1066-1074.