

S.S. Oncologia Molecolare ed Angiogenesi

Microambiente e prevenzione anti-tumorale

Linea di ricerca: 2 - Interazioni ospite-tumore

Programma: a - Infiammazione, immunità innata e tumore

Responsabile: Nicoletta Ferrari

Partecipanti: Roberto Benelli, Sebastiano Carlone, Stefano Monteghirfo, Alessandra Forlani, Claudio Malfatto

Durata: 2006-2008

Parole chiave: microambiente; infiammazione; chemochine

Altre strutture IST: S.S. Genomica Funzionale; S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: prevenzione primaria-secondaria

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute; Compagnia di San Paolo

Background

Tutte le forme tumorali, nella fase iniziale, sono fortemente influenzate dal microambiente circostante. Infatti anche se ogni tumore solido ha una sua storia ed evoluzione clinica, questo non può prescindere dal supporto delle cellule sane dell'organismo che lo infiltrano e spesso aiutano a progredire verso forme più maligne. Questo gruppo di cellule associate al tumore rappresenta quindi a sua volta un nuovo bersaglio d'intervento, in cui l'efficacia terapeutica risulterà inversamente proporzionale al numero di stadi evolutivi che il tumore ha già compiuto. Da qui nasce la necessità di definire precisamente le componenti cellulari coinvolte e di individuare interventi di prevenzione mirata.

Mentre il ruolo fondamentale della vascolarizzazione è stato oggetto di intensi studi negli ultimi vent'anni e si è finalmente giunti all'applicazione clinica della terapia antiangiogenica, altre categorie cellulari di uguale interesse, quali i macrofagi ed i miofibroblasti infiltranti il tumore, sono ancora oggetto di intenso studio preclinico. Mentre il ruolo dell'angiogenesi è prevalentemente "meccanico" costituendo il vero "polmone" del tumore, miofibroblasti e macrofagi lavorano in maniera più fine supportando la malignità del tumore con la produzione di numerosi mediatori solubili, in grado di incrementarne la proprietà invasive, proliferative ed antiapoptotiche.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

- Fornire una base sperimentale per lo sviluppo di strumenti diagnostici capaci di monitorare lo status pro-tumorale del microambiente del colon, con particolare attenzione ai miofibroblasti.
- Identificare il ruolo di fattori pro-infiammatori quali determinanti dello switch citochinico di cellule tumorali e del microambiente.

Beneficiari

Comunità scientifica, routine diagnostica, eventuale applicazione terapeutica.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Colon: abbiamo analizzato una casistica di campioni paraffinati costituita da adenomi a basso grado, ad alto grado con aree cancerizzate e veri adenocarcinomi, tramite immunocistochemica, caratterizzando il microambiente tumorale con i principali marcatori cellulari. La colorazione per COX-2, effettuata con due diversi anticorpi (su 4 testati con vari saggi di validazione), ha dato un risultato già presente in alcuni lavori pubblicati, ma non ancora accettato: nell'adenoma COX-2 appare espresso quasi esclusivamente dalla componente miofibroblastica e praticamente mai dall'epitelio tumorale; inoltre la positività di COX-2 è rara e ben localizzata nelle sole aree superficiali in cui sia presente un danno tissutale, quindi da imputarsi a processi rigenerativi piuttosto che al tumore stesso. Questo quadro è sovvertito nell'adenocarcinoma, in cui COX-2 è ben espressa e localizzata sia nel microambiente che a livello tumorale. Il dato è stato validato con diverse metodiche e doppie colorazioni in fluorescenza e western blot. Questo dato sovverte e reinterpretava l'uso di farmaci inibitori di COX-2 nella prevenzione dei carcinomi del colon.

Data questa rilevanza dei fibroblasti tumore-associati abbiamo deciso di effettuare un'analisi dei fattori solubili prodotti da queste cellule confrontandoli con il pannello di citochine rilevabili in linee tumorali di colon e a livello di biopsie di adenoma ed adenocarcinoma. Utilizzando dei cytokine-antibody-array abbiamo analizzato i residui di campioni diagnostici in OCT di mucosa sana (3), adenoma benigno (6) ed adenocarcinoma (3) del colon, ottenuti dalla nostra Anatomia Patologica. Abbiamo quindi analizzato i lisati cellulari ed i surnatanti di 4 linee tumorali di colon per individuare il pannello di citochine e fattori di crescita rilasciate. Infine abbiamo analizzato due colture primarie di miofibroblasti. Il nostro studio, benché la casistica appaia limitata, indica una marcata suddivisione di compiti tra l'epitelio tumorale ed i miofibroblasti, questi ultimi risultando la principale fonte di chemochine e citochine infiammatorie, mentre da parte del tumore prevalgono segnali immunomodulatori e stimolazioni autocrine.

Prostata: abbiamo trasfettato la linea di carcinoma prostatico umano PC-3 con un costrutto d'espressione per GBP-1, e con vettore vuoto. Abbiamo quindi effettuato un'analisi genomica dei pathways di modulazione indotti da questa molecola rispetto a quelli tipicamente riscontrati utilizzando i suoi attivatori naturali: TNFalfa e IFNalfa. Dall'analisi abbiamo ottenuto una lista di geni già noti per essere modulati da INF che però mostrano modulazioni di due tipi nelle cellule esprimenti GBP-1 che non sono state esposte alla citochina: un gruppo ha andamento coerente, l'altro viene

Consuntivo progetti RC 2006-2008

modulato in maniera opposta. Questo ci indica che anche se GBP-1 collabora con IFN nella risposta infiammatoria ed immunomodulatoria, il suo ruolo non è di mero mediatore, ma più probabilmente di vero regolatore della risposta attenuandone opportunamente alcune risposte.

Per valutare il ruolo dell'infiltrato delle singole popolazioni leucocitarie nella progressione del carcinoma prostatico abbiamo preparato dei costrutti plasmidici per l'espressione stabile di alcune chemochine attive su singole componenti cellulari del sistema immune innato (MCP-1 per monocito/macrofagi, Gro-alfa per granulociti neutrofili ed Eotassina per granulociti eosinofili). I costrutti in questione sono stati quindi utilizzati per trasdurre cellule di carcinoma prostatico murino TRAMP-C2. L'espressione forzata di queste citochine in vitro non altera significativamente le capacità proliferative e di sopravvivenza delle cellule trasdotte. Le cellule sono quindi state inoculate nel topo singenico c57/bl per evidenziare gli effetti di queste chemochine sulla crescita tumorale. Le tre chemochine hanno mostrato un comportamento analogo riducendo drasticamente la crescita tumorale, mostrandosi Gro-alfa il più efficace. L'effetto antitumorale è evidente nonostante che Gro-alfa sia notoriamente pro-angiogenica e quindi teoricamente favorevole alla crescita tumorale. I tumori esperimenti Gro-alfa risultano notevolmente più piccoli nonostante che al loro interno contengano vasi perfettamente formati. Abbiamo poi testato le sole cellule Gro-alfa diluendole 1:10 ed 1:100 con le cellule wild type, allo scopo di valutare eventuali effetti "by-stander". Questo esperimento ci ha dimostrato che l'efficacia terapeutica è direttamente proporzionale al numero di cellule Gro-alfa presenti, ma in nessun caso si è osservato un effetto di promozione. Abbiamo svolto esperimenti in vivo a breve termine per analizzare l'infiltrato del microambiente tumorale; abbiamo inoltre estesa una sperimentazione oltre il mese per verificare l'eventuale insorgenza tardiva di tumori resistenti.

Sorprendentemente l'analisi istologica non si è rivelata in grado di discriminare il tumore wild type da quello esprimente Gro-alfa: ambedue le tipologie tumorali presentano infiltrazione di macrofagi e cellule mesenchimali, rarissimi linfociti T, nessuna cellula NK, livelli di Ki67 comparabili e simili tassi apoptotici (valutati con TUNEL). Se mantenuti in vivo a lungo alcuni tumori esperimenti Gro-alfa alla fine generano forme altamente aggressive, che tuttavia sono risultate essere non esperimenti Gro-alfa. La nuova trasduzione di queste cellule con un costrutto lentivirale, capace di sostenere una produzione di Gro-alfa non silenziata, ancora una volta non modifica il fenotipo cellulare in vitro, tuttavia fa sì che i tumori wt e quelli riesperimenti Gro-alfa pur crescendo in vivo in modo paragonabile abbiano comportamenti invasivi opposti. Mentre il tumore parentale aggressivo invade rapidamente il sottocute giungendo a infiltrare il costato, quello esprimente Gro-alfa resta localizzato ed incapace di invadere. L'analisi proteomica di numerosi marcatori, tra cui MMP2, 3, 9 e TIMP1, 2 non ha tuttavia dimostrato variazioni significative nelle due popolazioni tumorali in vivo. Nonostante quindi il vistoso e riproducibile effetto antitumorale di Gro-alfa, non siamo attualmente in grado di spiegarne i meccanismi d'azione.

Elenco pubblicazioni:

Benelli R.-Lorusso G.-Albini A.-Noonan D.

Cytokines and chemokines as regulators of angiogenesis in health and disease.

Curr. Pharm. Des. 12:3101/3115, 2006

Tettamanti G.-Malagoli D.-Benelli R.-Albini A.-Grimaldi A.-Perletti G.-Noonan D.-De Eguileor M.-Ottaviani E.

Growth factors and chemokines: a comparative functional approach between invertebrates and vertebrates.

Curr. Med. Chem. 13:2737/2750, 2006

Albini A.-Benelli R.

The chemoinvasion assay: a method to assess tumor and endothelial cell invasion and its modulation.

Nat. Protoc. 2:504/511, 2007

Benelli R.

Aspirin, COX/2, and the risk of colorectal cancer. Letter.

N. Engl. J. Med. 357:824, 2007

Dell'Aica I.-Niero R.-Piazza F.-Cabrelle A.-Sartor L.-Colalto C.-Brunetta E.-Lorusso G.-Benelli R.-Albini A.-Calabrese F.-Agostini C.-Garbisa S.

Hyperforin blocks neutrophil activation of matrix metalloproteinase/9, motility and recruitment, and restrains inflammation triggered angiogenesis and lung fibrosis.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 321:492/500, 2007

Indraccolo S.-Pfeffer U.-Minuzzo S.-Esposito G.-Roni V.-Mandrizzato S.-Ferrari N.-Anfosso L.-Dell'eva R.-Noonan D.-Chieco Bianchi L.-Albini A.-Amadori A.

Identification of genes selectively regulated by IFNs in endothelial cells.

J. Immunol. 178:1122/1135, 2007

Larghero P.-Vene' R.-Minghelli S.-Travaini G.-Morini M.-Ferrari N.-Pfeffer U.-Noonan D.-Albini A.-Benelli R.

Biological assays and genomic analysis reveal lipoic acid modulation of endothelial cell behavior and gene expression.

Carcinogenesis 28:1008/1020, 2007

Noonan D.-Benelli R.-Albini A.

Angiogenesis and cancer prevention: a vision.

Recent Results Cancer Res. 174:221/226, 2007

Bianco R.-Rosa R.-Damiano V.-Daniele G.-Gelardi T.-Garofalo S.- Tarallo V.-De Falco S.-Melisi D.-Benelli R.-Albini A.-Ryan A.- Ciardiello F.-Tortora G.

Vascular endothelial growth factor receptor/1 contributes to resistance to anti epidermal growth factor receptor drugs in human cancer cells.

Clin. Cancer Res. 14:5069/5080, 2008

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Inflammation and angiogenesis: new targets for tumor prevention

Linea di ricerca: 2 – Interazioni ospite-tumore

Programma: e - angiogenesi

Responsabile: Nicoletta Ferrari

Partecipanti: Roberto Benelli, Stefano Monteghirfo, Sebastiano Carlone, Michele Lo Casto, Claudio Malfatto

Durata: 2006-2008

Parole chiave: infiammazione; angiogenesi; chemioprevenzione

Altre strutture IST: S.C. Biologia Cellulare; S.S. Tumori Urologici; S.S. Embriogenesi e Tumorigenesi su Modelli Animali

Altri Enti coinvolti: MultiMedica, Milano (A. Albini)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: prevenzione primaria/secondaria

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute

Background

Nel corso della progressione tumorale il network complesso che regola le interazioni fra cellule ed il tessuto circostante subisce profonde alterazioni. Le limitazioni delle terapie a singolo agente richiedono la pianificazione di nuovi approcci capaci di intervenire contemporaneamente sulle molteplici componenti del microambiente tumorale e di ristabilire nel suo insieme, quanto possibile, il controllo omeostatico all'interno dell'organo interessato. L'adattamento delle cellule tumorali alle terapie convenzionali rivela la presenza innata od acquisita di alterazioni molecolari nelle vie che regolano la proliferazione e l'attivazione di morte cellulare. Queste sono a loro volta rafforzate dall'attività citoprotettiva esercitata da fattori di crescita a livello autocrino e paracrino. Parte di questi mediatori solubili sono indotti proprio dallo stato infiammatorio cronico che accompagna la malattia neoplastica, capace tra l'altro di impedire un'efficace risposta immune anti tumorale. Gli stessi processi infiammatori sono spesso mediatori dei fenomeni di neovascolarizzazione che accompagnano la massa tumorale; non a caso alcune chemochine, nate per reclutare specifiche popolazioni leucocitarie, mostrano spiccate proprietà proangiogeniche. Ad ogni stadio della storia naturale del tumore, l'angiogenesi rappresenta un potenziamento delle capacità adattative della neoplasia alle avversità del microambiente tumorale, fornendo l'ossigeno ed i nutrienti necessari a cellule in attiva e continua replicazione. Con questo progetto abbiamo sviluppato studi mirati sul microambiente tumorale utilizzando molecole caratterizzate da limitati effetti indesiderati e quindi utilizzabili per una prevenzione "cronica" di alcune forme tumorali. Il supporto, e la premessa, di tale ipotesi risiede nelle numerose evidenze sperimentali che dimostrano come l'attività di molecole chimicamente differenti ed incidenti su processi distinti (farmaci chemiopreventivi, inibitori di vie di trasduzione dei segnali di sopravvivenza, chemochine, citochine antiinfiammatorie) possiedano attività antiangiogenica, antiinfiammatoria e, spesso, pro-apoptica.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

- identificare potenziali biomarcatori intermedi di risposta al trattamento, selezionando i bersagli condivisi dall'attività antiinfiammatoria/antiangiogenica di un pannello di molecole biologiche appartenenti a categorie terapeutiche differenti (chemiopreventivi, inibitori di vie di trasduzione dei segnali di sopravvivenza cellulare e infiammazione).
- sperimentare nuove strategie antitumorali con l'impiego di farmaci chemiopreventivi e citochine/chemochine come singoli agenti od in opportuni regimi di combinazione, in modelli di tumore solido (prostata) e in leucemie.
- studiare i meccanismi di promozione mediati dal microambiente tumorale. Acquisire e approfondire conoscenze sul ruolo della risposta infiammatoria nello sviluppo e nella progressione tumorale e mettere a punto strategie terapeutiche sperimentali per il controllo della risposta immune antitumorale.

Beneficiari

La comunità scientifica per la divulgazione dei dati e successivamente il paziente neoplastico una volta avviati protocolli sperimentali

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Mediante saggi di angiogenesi in vitro e in vivo, utilizzando cellule endoteliali, abbiamo selezionato nuove molecole ad attività anti-angiogenica. Tali molecole, tra cui l'acido lipoico, deguelina e xantumolo, appartengono alla categoria di sostanze chemiopreventive ad azione anti-ossidante (flavonoidi, isoflavonoidi, catechine) mentre fenretinide (4HPR) ha proprietà pro-ossidanti.

Una serie di studi condotti utilizzando acido lipoico hanno portato alla comprensione del suo meccanismo d'azione. L'acido lipoico rappresenta fisiologicamente il coenzima della piruvato deidrogenasi ma assunto con la dieta assume una serie di attività accessorie favorendo uno status anti-ossidante ed agendo come ipoglicemizzante e anti-infiammatorio. Nonostante il suo uso frequente come integratore alimentare, o come farmaco, il suo possibile ruolo di agente modulatore dell'angiogenesi e della genesi tumorale è stato oggetto di rare osservazioni. I nostri studi descrivono, a livello genico e biochimico, i meccanismi d'azione responsabili dell'attività antiangiogenica e anti-tumorale della molecola. Studi analoghi, ma principalmente improntati alla comprensione delle vie di trasduzione intracellulare sono stati condotti utilizzando il rotenoide deguelina e il flavonoide xantumolo. Entrambe le molecole

Consuntivo progetti RC 2006-2008

mostrano evidenti proprietà angio-soppressive legate ad inattivazione di Akt e NF-kappaB e a modulazione di geni legati alla proliferazione cellulare/apoptosi quali p21, survivin e p53 e al controllo dell'angiogenesi (VEGF, IL8). NF-kappaB ha un ruolo essenziale nel processo infiammatorio, controllando la produzione di citochine e chemochine, COX-2 e fattori di crescita. NF-kB regola negativamente l'apoptosi, è responsabile dei fenomeni di chemio e radio-resistenza, è generalmente attivato nella cellula tumorale: da qui l'osservazione che molecole in grado di contrastare l'attivazione di NF-kB siano le molecole chemiopreventive d'elezione. Studi preclinici hanno dimostrato che NF-kB è determinante nell'insorgenza e progressione del tumore alla prostata e che la sovraespressione di p65 (componente di NF-kB) è un fattore di prognosi negativa. Le stesse osservazioni sono valide nel caso di tumori ematologici dove è dimostrato il ruolo determinante dell'angiogenesi e considerando il progenitore comune endoteliale/ematopoietico è plausibile ipotizzare un eventuale effetto sinergico operate dalle molecole in esame su tali patologie. Linee cellulari di leucemie mieloidi acute e croniche e leucemie fresche ottenute da pazienti, rispondono in maniera sorprendente a bassi dosaggi di xantumolo in termini di blocco della proliferazione, induzione di apoptosi, diminuzione del potenziale invasivo e delle proprietà pro-angiogeniche. Tali effetti sono associati a inibizione delle vie di segnale Akt e NF-kappaB. In leucemie croniche Bcr/Abl+, xantumolo agisce inoltre modulando i livelli d'espressione di Bcr/Abl senza modificare il suo stato di fosforilazione. Tale osservazione è di fondamentale importanza in quanto pazienti trattati con Imatinib sviluppano resistenza al composto in tempi relativamente brevi. Una terapia combinata Imatinib/Xantumolo potrebbe superare fenomeni di resistenza. A tale proposito abbiamo generato linee cellulari resistenti ad alte concentrazioni di Imatinib e constatato che tali cellule mostrano un'aumentata sensibilità a xantumolo. Per contro, non siamo stati in grado di generare linee cellulari resistenti a xantumolo. In associazione alla diminuita espressione di Bcr/Abl, xantumolo induce in maniera significativa l'espressione di p53. Linee cellulari di carcinoma della prostata androgeno resistenti (e quindi principali responsabili del processo di metastatizzazione) rispondono a concentrazioni anti-angiogeniche/sub-tossiche raggiungibili nella clinica (tra 1 e 10 micromolare) di xantumolo e fenretinide con riduzione della proliferazione e inibizione del fenotipo invasivo. Quest'ultimo è in particolare associato ad inibizione dell'attività di p-Fak ad opera di p-Akt. La diminuita attività di queste vie di segnale ad opera di fenretinide si associa ad aumentata attività di pGSK3beta in grado di ridurre l'attività trascrizionale di beta-catenina a livello nucleare. Tramite studi mirati, abbiamo dimostrato che fenretinide è in grado di contrastare la via di segnale Wnt, generalmente attivata nel carcinoma della prostata. In passato abbiamo dimostrato che BMP2, prodotto dalla cellula endoteliale esposta a fenretinide, è un possibile inibitore dell'angiogenesi. Nell'ottica di un possibile utilizzo di fenretinide nella chemoprevenzione del tumore alla prostata e considerando il ruolo ancora dibattuto di BMP2 nelle metastasi ossee, abbiamo valutato la risposta di cellule di carcinoma esposte a concentrazioni di BMP2 raggiungibili fisiologicamente. BMP2 è in grado di contrastare il fenotipo migratorio delle cellule di carcinoma e l'attività trascrizionale di beta-catenina, generando quindi in maniera paracrina gli stessi effetti prodotti da fenretinide sulla cellula tumorale. Questi risultati forniscono il razionale per sperimentazioni pre-cliniche che, come riportato nei nostri obiettivi, possano produrre contemporaneamente effetti a livello di cellula tumorale e di microambiente mediante l'utilizzo di una sola molecola. Sempre nell'ambito di strategie terapeutiche in cui una molecola possa esercitare funzione duplice (a livello di cellula tumorale e di microambiente) abbiamo condotto una serie di esperimenti utilizzando taxotere a bassissimo dosaggio, ma per tempi lunghi. Il vantaggio di tale approccio, definito metronomico, è di non causare effetti tossici al paziente e soprattutto di tenere costantemente sotto controllo il processo di neoangiogenesi. A concentrazioni nell'ordine del picomolare, il taxotere è in grado di controllare la proliferazione della cellula tumorale di prostata, ma soprattutto conferisce alla cellula tumorale un fenotipo anti-angiogenico associato a ridotta produzione di VEGF (fattore pro-angiogenico) e aumentata secrezione di AGT e TSP-1 (fattori anti-angiogenici). Studi molecolari hanno identificato in hnRNP K il possibile mediatore degli effetti osservati e studi futuri sono diretti a comprendere se tale gene possa essere considerato un fattore di diagnosi/prognosi nel carcinoma prostatico.

Elenco pubblicazioni:

Albini A.-Dell'Eva R.-Vene' R.-Ferrari N.-Buhler D.-Noonan D.-Fassina G.
Mechanisms of the antiangiogenic activity by the hop flavonoid xanthohumol: NF/kappaB and Akt as targets.
FASEB J. 20:527/529, 2006

Albini A.-Noonan D.-Ferrari N.
Molecular pathways for cancer angioprevention.
Clin. Cancer Res. 13:4320/4325, 2007

Dell'Eva R.-Ambrosini C.-Minghelli S.-Noonan D.-Albini A.-Ferrari N.
The Akt inhibitor deguelin, is an angiopreventive agent also acting on the NF/(kappa)B pathway.
Carcinogenesis 28:404/413, 2007

Dell'Eva R.-Ambrosini C.-Vannini N.-Piaggio G.-Albini A.-Ferrari N.
AKT/NF/kappaB inhibitor xanthohumol targets cell growth and angiogenesis in hematologic malignancies.
Cancer 110:2007/2011, 2007

Larghero P.-Vene' R.-Minghelli S.-Travaini G.-Morini M.-Ferrari N.-Pfeffer U.-Noonan D.-Albini A.-Benelli R.
Biological assays and genomic analysis reveal lipoic acid modulation of endothelial cell behavior and gene expression.
Carcinogenesis 28:1008/1020, 2007

Manduca P.-Castagnino A.-Lombardini D.-Marchisio S.-Soldano S.-Ulivi V.-Zanotti S.-Garbi C.-Ferrari N.-Palmieri D.
Role of MT1-MMP in the osteogenic differentiation.
Bone Epub Nov 5, 2008

Monteghirfo S.-Tosetti F.-Ambrosini C.-Stigliani S.-Pozzi S.-Frassoni F.-Fassina G.-Soverini S.-Albini A.-Ferrari N.
Antileukemia effects of xanthohumol in Bcr/Abl transformed cells involve nuclear factor/(kappa)B and p53 modulation.
Mol. Cancer Ther. 7:2692/2702, 2008

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Palmieri D.-Astigiano S.-Barbieri O.-Ferrari N.-Marchisio S.-Ulivi V.-Volta C.-Manduca P.
Procollagen I COOH terminal fragment induces VEGF/A and CXCR4 expression in breast carcinoma cells.
Exp. Cell Res. 314:2289/2298, 2008

Benelli R.-Monteghirfo S.-Balbi C.-Barboro P. and Ferrari N.
Novel antivascolar efficacy of metronomic Taxotere therapy in prostate cancer: hnRNP K as a player.
Int. J. Cancer, under revision