

S.C. Biologia Cellulare

Il redox extracellulare nei tumori: caratterizzazione, effetti sulla progressione neoplastica, possibile modulazione farmacologica

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: a - Ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica

Responsabile scientifico: Patrizia Castellani

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Francesca Tosetti, Roberta Venè, Laura Borsi, Caterina Pellecchia, Anna Rubartelli, Laura Delfino

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: redox; risposta antiossidante; triossido di arsenico

Altre strutture IST partecipanti: S.S. Oncologia Molecolare e Angiogenesi

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Istituto Superiore di Sanità, Italia/USA Malattie Rare; Compagnia di San Paolo; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

Background

L'infiammazione cronica è un evento cruciale nella formazione del microambiente tumorale e nello sviluppo e nella progressione del tumore. I fattori principali della relazione tra infiammazione e cancro, presenti nel microambiente tumorale, possono essere classificati in tre principali categorie: 1. molecole rilasciate dalle cellule danneggiate (DAMPs); 2. mediatori solubili secreti dalle cellule neoplastiche o dalle cellule infiammatorie (citochine e chemochine); 3. fattori fisico-chimici (redox e tensione di O₂). In questo progetto focalizzeremo l'attenzione sul ruolo dei DAMPs e del redox nello sviluppo del microambiente tumorale.

I DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern molecules) sono molecole o macromolecole rilasciate da cellule danneggiate, con ruoli multiformi nell'infiammazione. Alcuni DAMPs, tra cui HMGB1, sono sovraespressi nei tumori e sono stati proposti mediare la progressione neoplastica tramite induzione di angiogenesi, reclutamento di cellule staminali, attivazione del rilascio di citochine e chemochine da parte delle cellule del sistema immunitario innato. I meccanismi molecolari alla base di questi effetti dei DAMPs nei tumori sono ancora largamente sconosciuti.

Nei tessuti, in condizioni fisiologiche, il redox intracellulare è fortemente ridotto, mentre è ossidante nell'ambiente extracellulare. Il redox del microambiente tumorale è alterato dalla presenza di un forte stress ossidativo, che comporta danni a cellule e macromolecole. Abbiamo recentemente osservato che la risposta anti-ossidante a tale stress può sovrastare lo stress ossidativo e modificare in senso riducente il microambiente tumorale, promuovendo a sua volta la progressione tumorale. La risposta antiossidante è mediata da vari meccanismi, enzimatici (ROS scavengers, reductasi quali la tioredoxina e altri) e non enzimatici, in primis il glutatione. Inoltre, è stato recentemente dimostrato in cellule di linfoma B che un efficiente ciclo redox cistina/cisteina, con un aumentato uptake di cistina attraverso il trasportatore di cistina xCT, seguito da riduzione intracellulare di cistina a cisteina e rilascio di alti livelli di cisteina ridotta all'esterno della cellula, crea un ambiente extracellulare ridotto che ripristina l'omeostasi redox in risposta ad uno stress ossidativo senza elevare i livelli intracellulari di glutatione: tale ambiente ridotto rende le cellule resistenti all'apoptosi indotta da farmaci. Abbiamo recentemente osservato che tale meccanismo anti-ossidante con rilascio extracellulare di cisteina ridotta è attivo in cellule immuni e influenza alcune risposte, sia dell'immunità innata che adattativa. Queste osservazioni focalizzano l'attenzione sul ruolo del redox extracellulare in risposta allo stress ossidativo. Infatti, mentre la modulazione del redox intracellulare è stata a lungo studiata e riconosciuta essenziale per molti eventi fisiologici o patologici inclusi infiammazione, sviluppo e progressione tumorale, poca attenzione era stata data finora al redox extracellulare come modulatore di attività cellulari.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo generale del progetto è la definizione dei meccanismi coinvolti nella formazione di un fenotipo anti-ossidante in cellule tumorali (carcinomi polmonari, melanomi) e le conseguenze sulla progressione tumorale. Valuteremo se il fenotipo redox è responsabile della diversa sensibilità delle cellule neoplastiche di tumori diversi a farmaci antineoplastici pro-ossidanti (in particolare triossido di arsenio, As₂O₃) e studieremo il tipo di risposta anti-ossidante a tali farmaci (prevalente aumento di GSH, di tioredoxina, di Xct con aumento del ciclo cistina/cisteina). Sulla base della risposta anti-ossidante osservata, valuteremo l'efficacia dell'associazione di As₂O₃ con altri farmaci redox-attivi, che hanno come bersaglio specifiche risposte anti-ossidanti. Un altro obiettivo del progetto si basa sull'assunto che i DAMPs proteici, quali HMGB1, sono sensibili all'ossidazione e dovrebbero essere rapidamente inattivati in ambiente ossidante; al contrario, la loro emivita dovrebbe essere allungata da condizioni riducenti. Su queste basi, valuteremo l'attività pro-angiogenica e immunostimolante di HMGB1 e l'eventuale modulazione di tali attività da parte del redox, ossidante o riducente, del microambiente, in sistemi in vitro e in vivo in modelli animali.

Programmazione 2009-2011

Impatto assistenziale certo o potenziale

Il progetto mira all'identificazione, in diversi tumori, di fenotipi redox che reagiscano a farmaci proossidanti utilizzando diversi tipi di difesa anti-ossidante. La risposta anti-ossidante prevalente nei singoli tumori rappresenta un ottimo bersaglio per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche, atte a controllare le difese anti-ossidanti della cellula neoplastica e utilizzabili quindi a sostegno dei chemioterapici pro-ossidanti tradizionali.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Nel triennio 2009-2011 analizzeremo il fenotipo redox di diverse linee cellulari tumorali, la sua eventuale correlazione con il livello di aggressività, la sensibilità a As₂O₃, come esempio di farmaco pro-ossidante, e il tipo di risposta anti-ossidante al trattamento con tale farmaco. Sulla base delle indicazioni ottenute, diversi farmaci redox attivi, mirati a bloccare selettivamente i vari meccanismi anti-ossidanti attivati da As₂O₃ nelle cellule neoplastiche, saranno utilizzati con As₂O₃. Questi trattamenti permetteranno di identificare l'associazione farmacologica più idonea a uccidere le cellule neoplastiche, sulla base del fenotipo redox basale o indotto da As₂O₃. Parallelamente a questi esperimenti, porteremo avanti esperimenti volti a definire il ruolo angiogenetico di HMGB1 e la sua modulazione da parte del redox. HMGB1 sarà iniettato in pellets di matrigel sottocute in topi Balb/c e il potenziale angiogenico in condizioni di redox ossidante o riducente sarà valutato. In vitro, la capacità chemotattica di HMGB1 su varie cellule infiammatorie e di reclutamento, attivazione e maturazione delle cellule dendritiche sarà valutata in condizioni ossidanti o riducenti.

Nel primo anno di attività, valuteremo il fenotipo redox di linee cellulari di tumori quali linee di melanomi ottenute da biopsie di melanomi primari e linee di carcinoma ovarico a vari stadi. In particolare, studieremo i seguenti parametri: produzione basale di ROS; livelli intracellulari e secreti di GSH e cisteina ridotti; espressione di xCT; espressione, sintesi e secrezione di vari enzimi redox-attivi (TRX, TRX reduttasi, TRX binding protein 2, HO-1). Il fenotipo redox sarà quindi confrontato con parametri di aggressività delle diverse linee tumorali (proliferazione, apoptosi spontanea, potenziale metastatico, in vitro e in vivo). Questo permetterà di evidenziare una eventuale correlazione tra fenotipo redox e aggressività.

In seguito, gli stessi parametri saranno valutati in normoxia e in ipoxia per determinare il ruolo della tensione di O₂ sul redox e la progressione tumorale. Inoltre, per capire se la sensibilità a As₂O₃ dipende o meno dal fenotipo redox e dal tipo di risposta anti-ossidante, le diverse linee cellulari saranno trattate con As₂O₃ e il tipo di risposta anti-ossidante sarà valutato in termini di regolazione di espressione, sintesi e secrezione di ossido-reduttasi, espressione di xCT, livelli di GSH, rilascio di cisteina. Sulla base del tipo di risposta anti-ossidante prevalente osservato nelle diverse linee tumorali, utilizzeremo altri farmaci redox-attivi, specifici per diversi meccanismi pro-ossidanti, da soli o in associazione con As₂O₃. In particolare, valuteremo l'effetto di Sulfosalazina (SASP) che inibisce l'uptake di cisteina mediato da xCT e quindi il rilascio di cisteina, e di DL-Buthionine-[S,R]-Sulfoximine (BSO) un inibitore di gamma-glutamyl-cysteine synthase, enzima coinvolto nella sintesi di GSH e di DCNB, un composto che inibisce l'attività di tioredoxina.

Infine, valuteremo se, come osservato in cellule di linfoma, anche in altri tipi di tumore solido la sovraespressione di xCT comporta una aumentata resistenza all'apoptosi indotta da farmaci pro-ossidanti. Al contrario, valuteremo se il silenziamento di xCT rende le cellule maggiormente sensibili ai farmaci pro-ossidanti o se invece risposte anti-ossidanti alternative riescono a vicariare la mancanza di xCT. Esperimenti simili saranno portati avanti con TRX.

Una volta compresi i meccanismi molecolari che avvengono su cellule in vitro ci proponiamo di confermare i nostri risultati con esperimenti in vivo su tessuti normali e tumorali umani e/o su organi linfoidi secondari di topi naive o iniettati con globuli rossi di montone per provocare una risposta immunitaria. Come già dimostrato in nostri precedenti lavori, un microambiente riducente è cruciale per dare l'avvio alla risposta immunitaria. Metteremo quindi a punto colorazioni specifiche per gruppi SH liberi (Mercury Orange) e per ROS (peroxygreen) su campioni di tumori umani primari ottenuti da pezzi operatori, per la valutazione e la localizzazione in vivo dello stato redox.

Track record

Ellerman J.E.-Brown C.K.-De Vera M.-Zeh H.J.-Billiar T.-Rubartelli A.-Lotze M.T.
Masquerader: high mobility group box-1 and cancer.
Clin. Cancer. Res. 13:2836/2848, 2007

Lotze M.T.-Deisseroth A.-Rubartelli A.
Damage associated molecular pattern molecules.
Clin. Immunol. 124:1/4, 2007

Lotze M.T.-Zeh H.J.-Rubartelli A.-Sparvero L.J.-Amoscato A.A.-Washburn N.R.-Devera M.E.-Liang X.-Tör M.-Billiar T.
The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity.
Immunol. Rev. 220:60/81, 2007

Mortara L.-Balza E.-Sassi F.-Castellani P.-Carnemolla B.-De Lerma Barbaro A.-Fossati S.-Tosi G.-Accolla R.S.-Borsi L.
Therapy-induced antitumor vaccination by targeting tumor necrosis factor alpha to tumor vessels in combination with melphalan.
Eur. J. Immunol. 37:3381/3392, 2007

Rubartelli A.-Lotze M.T.
Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox.
Trends Immunol. 28:429/436, 2007

Castellani P.-Angelini G.-Delfino L.-Matucci A.-Rubartelli A.
The thiol redox state of lymphoid organs is modified by immunization: role of different immune cell populations.
Eur. J. Immunol. 38:2419/2425, 2008

Ceccarelli J.-Delfino L.-Zappia E.-Castellani P.-Borghi M.-Ferrini S.-Tosetti F.-Rubartelli A.

Programmazione 2009-2011

The redox state of the lung cancer microenvironment depends on the levels of thioredoxin expressed by tumor cells and affects tumor progression and response to prooxidants.
Int. J. Cancer 123:1770/1778, 2008

Balza E.-Sassi F.-Ventura E.-Parodi A.-Fossati S.-Blalock W.-Carnemolla B.-Castellani P.-Zardi L.-Borsi L.
A novel human fibronectin cryptic sequence unmasked by the insertion of the angiogenesis-associated extra type III domain B.
Int. J. Cancer 125:751/758, 2009

Carta S.-Castellani P.-Delfino L.-Tassi S.-Venè R.-Rubartelli A.
DAMPs and inflammatory processes: the role of redox in the different outcomes.
J. Leukoc. Biol. Epub Jun 29, 2009

Regolazione metabolica di farmaci antineoplastici redox-attivi: effetti sistemici e su morte e sopravvivenza cellulare nel microambiente tumorale

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: a - Ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica

Responsabile scientifico: Francesca Tosetti

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Patrizia Castellani, Roberta Venè, Laura Delfino, Massimo Ardy

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: trasduzione del segnale; morte cellulare programmata; metabolismo; redox; glucosio; ipossia

Altre strutture IST partecipanti: S.S. Oncologia Molecolare e Angiogenesi (N. Ferrari, R. Benelli); S.S. Biopolimeri e Proteomica (M. Rocco, A. Profumo)

Altri Enti coinvolti: S.C. Oncologia Medica, Ospedali Galliera, Genova (A. Decensi); S.S.D. Microcitemia, Ospedali Galliera, Genova (G. Forni)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Istituto Superiore di Sanità, Italia/USA Malattie Rare

Background

I farmaci antineoplastici modulatori del redox sono attualmente oggetto di intense ricerche precliniche e cliniche in quanto capaci di colpire selettivamente le cellule tumorali che producono elevati livelli di specie reattive di ossigeno (ROS). Lo stress ossidativo costitutivo dovuto all'attivazione di oncogeni e un'inefficiente respirazione mitocondriale richiede adattamenti metabolici e bioenergetici per mantenere un precario equilibrio redox intracellulare. Il passaggio ad un fenotipo glicolitico per la produzione di energia, tipico delle cellule trasformate, conferisce un vantaggio selettivo in condizioni ambientali critiche caratterizzate da scarsità di nutrienti ed ipossia. Mentre l'ipossia intermittente permette adattamenti che favoriscono la crescita del tumore attraverso la maggior produzione di enzimi glicolitici e fattori proangiogenici, uno stato ipossico severo porta a morte cellulare e correla con la comparsa di aree necrotiche ed infiammazione. Numerose evidenze suggeriscono che lo switch glicolitico contribuisca a mantenere l'equilibrio redox intracellulare fornendo riducenti equivalenti necessari ad alimentare i principali sistemi antiossidanti. Le vie di segnale mediate dall'oncogene ras e le MAP cinasi ERK-1/2, PI3K/AKT/mTOR/GSK3, i fattori di trascrizione hypoxia-inducibile transcription factor-1 (HIF-1) propagano informazioni mediate da fattori di crescita, insulina, citochine infiammatorie, con effetto omeostatico rispetto a variazioni delle condizioni ambientali anche nei tessuti normalmente ossigenati. La riprogrammazione trascrizionale controllata dall'attivazione costitutiva di queste vie omeostatiche modifica il microambiente a vantaggio del tumore promuovendo infiammazione ed angiogenesi e la progressione tumorale. Per esempio, GSK3 inibisce l'attività di Nrf2, un fattore di trascrizione che induce l'espressione di enzimi del metabolismo del glutatione (GSH) ed enzimi antiossidanti di fase 2; la sovraespressione di AKT sostiene lo switch glicolitico; l'attivazione di mTOR inibisce l'autofagia, un processo che protegge dalla scarsità di nutrienti, dalla tumorigenesi indotta da stress e dall'invecchiamento. Numerose evidenze sperimentali suggeriscono la possibilità di sfruttare gli adattamenti tumore-specifici come bersagli selettivi di terapia. In particolare, è stata dedicata speciale attenzione a farmaci che, utilizzando un codice redox (modulazione di ROS e GSH), sono in grado di interferire a più livelli con le vie di segnale che regolano in modo pleiotropico eventi chiave quali sopravvivenza cellulare, infiammazione ed angiogenesi. In tale contesto si stanno rivelando particolarmente promettenti farmaci di origine naturale o loro derivati sintetici come la curcumina (34 studi clinici registrati presso l'NIH), triterpenoidi e retinoidi sintetici tra i quali CDDO, o RTA402, e la fenretinide (4HPR), il PEITC (phenethyl isothiocyanate), il resveratrolo. Un dato recentemente emerso è che alcuni farmaci redox-attivi sono in grado di modulare il metabolismo glucidico, trovando quindi potenziale impiego nel trattamento della sindrome metabolica, dell'obesità e del diabete. E' noto che queste condizioni patologiche costituiscono fattori di rischio per lo sviluppo di tumori (colon, mammella, prostata). L'interesse in ambito oncologico

Programmazione 2009-2011

risiede nel fatto che tali farmaci esercitano un effetto citoprotettivo e chemiopreventivo sulle cellule normali e preneoplastiche, mentre uccidono le cellule tumorali con un'elevata selettività, a differenza dei tradizionali chemioterapici citotossici, modulando l'attività di bersagli molecolari fra i quali Sirt, Foxo ed AMPK, implicati nella regolazione del bilancio energetico a livello sistemico.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Il nostro obiettivo principale è di fornire dati sperimentali e clinici atti a promuovere l'impiego di farmaci modulatori dell'equilibrio redox di origine naturale, o loro derivati sintetici, per la prevenzione e la cura dei tumori. Per quanto alcuni dei farmaci menzionati siano attualmente utilizzati in numerosi studi clinici, evidenze preliminari del nostro gruppo di ricerca e di altri mostrano che alcuni tipi tumorali non rispondono o sono in grado di sviluppare resistenza a farmaci modulatori del redox. Gli studi preclinici proposti si prefiggono di comprendere i meccanismi molecolari responsabili della resistenza e testare alcune strategie farmacologiche in grado di potenziare l'attività di farmaci redox-attivi. A tale scopo utilizzeremo farmaci modulatori del metabolismo glucidico in combinazione con farmaci capaci di interferire con i meccanismi di difesa antiossidanti. Parallelamente, valuteremo fattori sierici correlati a stress ossidativo quali biomarcatori surrogati di rischio per cancro in soggetti sani o affetti da sindrome metabolica, ed indicatori di risposta e tossicità in pazienti oncologici.

Impatto assistenziale certo o potenziale

L'applicazione di strategie per la prevenzione del cancro comporterebbe un notevole guadagno in termini di sopravvivenza e qualità della vita per i soggetti ad aumentato rischio e, quindi, di tutela della salute pubblica da parte del SSN, oltre ad una riduzione della spesa sanitaria destinata ad interventi diagnostico-terapeutici ed assistenziali onerosi. Attualmente gli investimenti destinati alla ricerca sperimentale e clinica per la prevenzione del cancro in soggetti a rischio sono molto limitati. Tuttavia, la dimostrazione dell'efficacia e della sicurezza di trattamenti capaci di ridurre il rischio necessita di approfonditi studi a livello preclinico e clinico. L'utilizzo di farmaci di origine naturale con tossicità bassa o nulla, dotati di proprietà biologiche funzionali alla prevenzione e alla cura dei tumori, e contemporaneamente in grado di normalizzare condizioni patologiche predisponenti, potrebbe rappresentare una strategia preventiva efficace e a basso costo di grande impatto sanitario e sociale.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

I nostri studi in un modello murino di retinoblastoma mostrano che l'inibizione della crescita tumorale da parte del retinoide proossidante fenretinide è associato a inibizione dell'angiogenesi, innalzamento di ROS e morte cellulare lisosoma-dipendente, disattivazione di AKT ed mTOR. Abbiamo inoltre dimostrato che il triterpenoide CDDO-Me, che depleta il GSH intracellulare, induce morte cellulare mediata da disattivazione di GSK3 in cellule di adenocarcinoma prostatico androgeno-indipendenti PC3 e DU145. Studi effettuati da altri gruppi e da noi indicano quindi che alcune vie di segnale omeostatiche sono sensibili a stress redox. Abbiamo stabilizzato linee di diversa natura istologica (di retinoblastoma Y79 e WeriRb1, di adenocarcinoma prostatico PC3 e DU145, di glioblastoma U87) resistenti a fenretinide. I nostri risultati preliminari mostrano iperfosforilazione tempo-dipendente di GSK3, elevati livelli di GSH e maggior incorporazione di glucosio in alcune delle cellule resistenti rispetto alle wild-type.

Al fine di comprendere gli adattamenti dell'equilibrio redox che favoriscono la trasformazione e di testare a livello sperimentale strategie per il potenziamento dell'effetto terapeutico di farmaci redox-attivi, utilizzeremo modulatori del metabolismo redox e glucidico tra i quali il triterpenoide CDDO-Me ed il BSO (buthionine sulfoximine), due agenti che depletano il GSH, come singoli agenti od in combinazione con farmaci regolatori del metabolismo glucidico tra cui DCA (dichloroacetate) e la metformina. La ricerca, articolata come segue, esaminerà nelle cellule wild-type e nelle resistenti:

- le vie di segnale di sopravvivenza e di morte cellulare attivate da stress descritte, inclusa l'autofagia, in condizioni di normossia ed ipossia.
- lo stato di attivazione dei principali sistemi enzimatici antiossidanti intracellulari legati al metabolismo del GSH o meno (eme ossigenasi, superossido dismutasi, catalasi, glutatione-S-transferasi, glutatione sintasi, glutatione perossidasi, peroxiredoxina).
- l'espressione, la traslocazione nucleare e l'attività dei fattori di trascrizione Nrf2 ed HIF che regolano, rispettivamente, l'attivazione della risposta antiossidante ed il metabolismo glucidico.
- il metabolismo glucidico in termini di incorporazione e consumo di glucosio, l'espressione di glucosio-6-fosfato deidrogenasi e l'attività dello shunt degli esoso-monofosfati.

Grazie alla collaborazione con gli Ospedali Galliera, avremo la possibilità di valutare lo stato redox sistemico di soggetti affetti da sindrome metabolica, accertato fattore di rischio per il tumore della mammella e del colon, in trattamento con curcumina.

La struttura Biopolimeri e Proteomica IST, in collaborazione con la nostra unità, utilizzerà tecnologie della sieroproteomica per monitorare alcuni parametri indicativi di stress ossidativo. Saranno misurati la malonaldeide (MDA, derivato della perossidazione dei lipidi), gli isoprostani (IsoPS, derivati dalla perossidazione di acido arachidonico catalizzata da radicali liberi) ed il GSH circolante con tecniche di cromatografia liquida e spettrometria di massa e, parallelamente, con metodi biochimici.

Ci attendiamo di ottenere dati sperimentali e clinici a supporto dell'ipotesi da noi formulata che alcuni adattamenti metabolici precoci nel corso della tumorigenesi, quali lo switch glicolitico e l'insulino-resistenza, siano strettamente legati ad alterazioni dell'equilibrio redox ed antecedenti all'attivazione dell'angiogenesi e siano regolati da un pathway costituito da ROS/GSH/GSK3/Nrf2/HIF. Sulla base dei dati preliminari da noi ottenuti, i mediatori molecolari centrali di questa via regolativa potrebbero diventare bersagli prioritari in ambito chemiopreventivo e comunque importanti nella terapia dei tumori, attraverso l'impiego di farmaci di origine naturale redox-attivi.

Track record

Tosetti F.-Noonan D.M.-Albini A.

Choking hypoxia-inducibile factor 1 α : a novel mechanism for connective tissue growth factor inhibition of angiogenesis.

Programmazione 2009-2011

J. Natl. Cancer Inst. 98:946/948, 2006

Venè R.-Arena G.-Poggi A.-D'Arrigo C.-Mormino M.-Noonan D.M.-Albini A.-Tosetti F.
Novel cell death pathways induced by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide: therapeutic implications. Mol. Cancer Ther. 6:286/298, 2007

Ceccarelli J.-Delfino L.-Zappia E.-Castellani P.-Borghi M.-Ferrini S.-Tosetti F.-Rubartelli A.
The redox state of the lung cancer microenvironment depends on the levels of thioredoxin expressed by tumor cells and affects tumor progression and response to prooxidants.
Int. J. Cancer 123:1770/1778, 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-kappaB and p53 modulation.
Mol. Cancer Ther. 7:2692/702, 2008

Venè R.-Larghero P.-Arena G.-Sporn M.B.-Albini A.-Tosetti F.
Glycogen synthase kinase 3beta regulates cell death induced by synthetic triterpenoids.
Cancer Res. 17:6987/6996, 2008

Sogno I.-Venè R.-Sapienza C.-Ferrari N.-Tosetti F.-Albini A.
Anti-angiogenic properties of chemopreventive drugs: fenretinide as a prototype.
Recent Results Cancer Res. 181:71/76, 2009

Tosetti F.-Noonan D.M.-Albini A.
Metabolic regulation and redox activity as mechanisms for angioprevention by dietary phytochemicals.
Int. J. Cancer, in press

Studio dell'efficacia di farmaci antiinfiammatori e di farmaci attivi sul redox cellulare nell'infiammazione associata a tumore in modelli tumorali murini

Linea di ricerca: 2 – Interazioni Tumore-Ospite

Programma: a - Ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica

Responsabile scientifico: Enrica Balza

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Laura Borsi, Patrizia Castellani, Francesca Tosetti

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: infiammazione; carcinogenesi; microambiente tumorale; redox

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Background

Lo sviluppo di tumore in associazione all'infiammazione cronica è stato evidenziato in molte condizioni cliniche ed è supportato da studi in modelli animali di tumore (Krelin Y. et al, Cancer Res, 2007). La cancerogenesi chimica rappresenta, in vivo, il modello migliore per identificare i diversi stadi di formazione e di sviluppo del tumore (iniziazione, promozione e progressione) (Di Giovanni et al, J. Pharmacol. Ther., 1992) e per studiare l'infiammazione ad essi associata.

L'infiammazione cronica orchestra un microambiente permissivo e di supporto per il processo neoplastico (Vakkila J. Et al, Nat Rev Immunol, 2004). I fattori che legano infezione, immunità innata, infiammazione e cancro (Karin M. et al, Nat Rev Immunol, 2005) possono essere raggruppati in tre categorie principali: 1. molecole rilasciate dalle cellule che muoiono specialmente per necrosi (DAMPs) (Scaffidi P. et al, Nature, 2002.); 2. Mediatori solubili (fattori pro-angiogenici e citochine pro-infiammatorie quali TNF α e IL-1) secreti nel microambiente da cellule neoplastiche e/o infiammatorie (Vakkila J. Et al, Nat Rev Immunol, 2004.); 3. Fattori fisico-chimici come il redox e la tensione di O₂. Alterazioni dello stato redox nella sede di infiammazione cronica sono riconosciute come causa di sviluppo e progressione tumorale (Rubartelli A. et al, Trends Immunol, 2007) e ridotti livelli di O₂, siano essi transienti o cronici, inducono resistenza a chemioterapia e correlano con prognosi infausta (Cosse J.P. et al, Anticancer Agents Med Chem, 2008.). La Tioredoxina (Trx) (Tonissen K.F. et al, Mol. Nutr.Food Res., 2009) è una proteina del sistema antiossidante della cellula utilizzato per mantenere lo stato redox intracellulare. E' overespressa durante lo sviluppo tumorale (Kim S.J. et al, Clin.Cancer Res., 2005). Per questo motivo il sistema redox può essere considerato un target per la terapia farmacologica antitumorale. SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid) è un inibitore della istone-deacetilasi che up-regola gli inibitori endogeni di Tioredoxina (Trx) (Tonissen K.F. et al, Mol. Nutr. Food Res., 2009). Attualmente in trials clinici per diversi tipi di patologie neoplastiche (Tonissen and Di Trapani, Mol. Nutr.Food Res., 2009) SAHA è già approvato dalla FDA (2006) per il trattamento di linfomi cutanei. Altro evento critico nella carcinogenesi è l'overespressione dell'isozima Cox-2 (Muller-Decker K et al., PNAS, 2002) che, generalmente non espresso nei tessuti

Programmazione 2009-2011

normali ed espresso solo transientemente in risposta a citochine pro-infiammatorie e a danni tissutali, è costitutivamente espresso nelle lesioni preneoplastiche e nei tumori epiteliali (Dannenbergh A.J. et al, Lancet, 2001) individuandolo come target per farmaci antiinfiammatori non steroidei (NSAIDs) che ne inibiscono l'attività. Ibuprofen, come altri NSAIDs, inibisce non selettivamente Cox-2 ed ha mostrato efficacia chemiopreventiva sulla carcinogenesi cutanea nel topo (Muller-Decker et al, PNAS, 2002). All'infiammazione cronica si associano accumulo e attivazione delle cellule mieloidi soppressorie (MDSC) a livello del tessuto infiammatorio, del midollo osseo, della milza e del sangue periferico e delle cellule T regolatorie (Tregs) nella milza e nei linfonodi drenanti. Queste cellule svolgono un ruolo importante nell'immunosorveglianza e nel controllo delle attività immunitarie dell'ospite (Baniyash M., Nat.Rev.Immunol. 2004). L'accumulo di queste cellule immunosoppressorie (MDSCs e Tregs) aumenta in maniera consistente nel tessuto tumorale e negli organi linfoidi in presenza di tumore solido primario e metastatico (Ostrand-Rosenberg S et al, J. Immunology, 2009).

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo generale del progetto è la valutazione, nel modello murino di cancerogenesi chimica con singola iniezione s.c. di 3'-methyl-cholanthrene (MCA), a vari stadi di sviluppo e progressione del tumore, dello stato redox, dell'espressione di DAMPs e dell'efficacia preclinica, sia in prevenzione che in terapia, di farmaci antiinfiammatori non steroidei (NSAIDs), quale Ibuprofen, e attivi sul redox cellulare, quale l'inibitore della istone-deacetilasi SAHA. Studieremo inoltre, nelle diverse fasi di formazione e progressione del tumore, gli infiltrati tumorali di cellule infiammatorie e della immunità innata ed adattativa e, nella milza e linfonodi drenanti, la modulazione delle cellule immuno-soppressorie CD4+CD25+, Tregs, Gr1+CD11b+, MDSCs.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Identificazione di parametri associati ad infiammazione cronica ed allo stato redox per nuove strategie terapeutiche antitumorali

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Per prima cosa cercheremo di ottimizzare le procedure di carcinogenesi indotta con MCA valutando le condizioni che diano la più alta % di fibrosarcomi nel più breve tempo. Fibrosarcomi saranno indotti in topi Balb/C con singola iniezione sottocute di MCA, iniziando con 200µg/topo in 100µl di olio di oliva, di per sé iniziatore e promotore della carcinogenesi. Già dopo 15 giorni, nel 100% degli animali, dovremmo osservare granulomi nella sede di iniezione, mentre lo sviluppo di fibrosarcoma richiede un periodo di 3-5 mesi dall'iniezione. Gruppi di 10 topi Balb/C saranno utilizzati e gli animali saranno controllati almeno 2 volte a settimana per registrare, oltre alle condizioni generali ed al peso, ogni ispessimento palpabile e/o misurabile nella sede di iniezione di MCA. Il farmaco antiinfiammatorio Ibuprofen, per os e/o per applicazione topica (Lee et al., Toxicol Appl Pharmacol, 2003) e il farmaco attivo sul redox SAHA, per os e/o per iniezioni intraperitoneali (Spiller et al., J Neurooncol 2006), saranno somministrati quotidianamente iniziando, in studi di efficacia preventiva, 10 giorni prima dell'iniezione s.c. di MCA e, in studi di efficacia terapeutica, 24h dopo l'iniezione di MCA.

Quindi, negli animali trattati o meno con le terapie sopra dette ed in stadi diversi della formazione tumorale, valuteremo:

A - sul tessuto prelevato nella sede di induzione tumorale con MCA:

- l'infiltrazione locale di cellule infiammatorie e dell'immunità innata ed adattativa (tecniche di immunistoichimica),
- l'espressione di DAMPs (HMGB1, galectina 1) (tecniche di immunistoichimica),
- lo stato redox (colorazione tioli liberi con Mercury Orange) (analisi al microscopio confocale),
- lo stress ossidativo (colorazione con PeroxyGreen e CM-H2DCF-DA) (analisi al microscopio confocale);

B - negli organi linfoidi secondari (linfonodi drenanti e milza):

- la modulazione di cellule immuno-soppressorie (MDSC) e T regolatorie (Tregs) con analisi citofluorimetrica
- l'espressione di DAMPs (v. sopra) a livello di questi organi con tecniche di immunistoichimica,
- lo stato redox e lo stress ossidativo (vedi sopra) con analisi al microscopio confocale.

Nel modello murino di cancerogenesi chimica con inoculo s.c. di MCA, entro il 2009 ci aspettiamo di aver definito a vari stadi di induzione del fibrosarcoma:

- nel tessuto sede di induzione tumorale, lo stato redox, lo stress ossidativo, l'espressione di DAMPs e gli infiltrati cellulari infiammatori e dell'immunità;
- negli organi linfoidi secondari, lo stato redox, lo stress ossidativo, l'espressione di DAMPs e la modulazione delle cellule MDSCs (Gr1+CD11+) e Tregs (CD4+CD25+)

Track record

Balza E.-Mortara L.-Sassi F.-Monteghirfo S.-Carnemolla B.-Castellani P.-Neri D.-Accolla R.S.-Zardi L.-Borsi L.
Targeted delivery of tumor necrosis factor- α to tumor vessels induces a therapeutic T cell-mediated immune response that protects the host against syngeneic tumors of different histologic origin.
Clin. Cancer Res. 12(8):2575/2582, 2006

Mortara L.-Balza E.-Sassi F.-Castellani P.-Carnemolla B.-De Lerma Barbaro A.-Fossati S.-Tosi G.-Accolla R.S.-Borsi L.
Therapy-induced antitumor vaccination by targeting tumor necrosis factor α to tumor vessels in combination with melphalan.
Eur. J. Immunol. 37(12):3381/3392, 2007

Castellani P.-Angelini G.-Delfino L.-Matucci A.-Rubartelli A.
The thiol redox state of lymphoid organs is modified by immunization: role of different immune cell populations.
Eur. J. Immunol. 38:2419/2425, 2008

Ceccarelli J.-Delfino L.-Zappia E.-Castellani P.-Borghi M.-Ferrini S.-Tosetti F.-Rubartelli A.

Programmazione 2009-2011

The redox state of the lung cancer microenvironment depends on the levels of thioredoxin expressed by tumor cells and affects tumor progression and response to prooxidants.
Int. J. Cancer 123:1770/1778, 2008

Carta S.-Castellani P.-Delfino L.-Tassi S.-Venè R.-Rubartelli A.
DAMPs and inflammatory processes: the role of redox in the different outcomes.
J. Leukoc. Biol. Epub Jun 29, 2009

Tassi S.-Carta S.-Venè R.-Delfino L.-Ciriolo MR.-Rubartelli A.
Pathogen-induced interleukin-1beta processing and secretion is regulated by a biphasic redox response.
J. Immunol. 183(2):1456/1462, 2009

Il ruolo del redox nella risposta immune innata e antigenica specifica

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: b - Risposta immunitaria antitumorale: interazioni cellulari, fattori solubili e recettori

Responsabile scientifico: Anna Rubartelli

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Massimo Ardy, Patrizia Castellani, Laura Delfino, Caterina Pellecchia, Sonia Carta, Sara Tassi, Roberta Venè, Ilaria Pettinati

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: interleuchina-1; monociti; cellule dendritiche; linfociti B; redox; infiammazione

Altri Enti coinvolti: U.O. Pediatria II, Istituto G. Gaslini, Genova (M. Gattorno)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Telethon; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

Background

L'infiammazione è un fattore chiave in sviluppo, decorso e risoluzione di molte patologie umane, inclusa la malattia neoplastica. Numerose evidenze indicano che l'infiammazione, sia acuta che cronica, è modulata a vari livelli dallo stato del redox. La modulazione del redox è un evento fisiologico: specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono generate durante il metabolismo energetico e sono coinvolte nel signaling; sistemi anti-ossidanti enzimatici (quali tioredoxina e altre ossido-reduttasi intracitoplasmatiche) e non enzimatici (quali il glutatione) impediscono l'eccessivo accumulo di ROS e mantengono l'omeostasi del redox.

Nel corso di molte reazioni infiammatorie la produzione di ROS aumenta fortemente per l'attivazione di sistemi enzimatici quali la NADPH ossidase. Questi ROS contribuiscono al corretto sviluppo e esito dell'infiammazione, ma devono essere eliminati per prevenire danni tissutali. I ROS prodotti durante le reazioni infiammatorie sono detossificati dagli stessi sistemi anti-ossidanti attivi in condizioni fisiologiche, introdotti sopra. Inoltre, un nuovo meccanismo anti-ossidante capace di ripristinare l'omeostasi del redox in risposta ad uno stress ossidativo senza elevare i livelli intracellulari di glutatione è stato recentemente proposto: in cellule di linfoma B, un efficiente ciclo redox cistina/cisteina, con un aumentato uptake di cistina attraverso il trasportatore di cistina xCT, seguito da riduzione intracellulare di cistina a cisteina e rilascio di alti livelli di cisteina ridotta all'esterno della cellula, crea un ambiente extracellulare ridotto che ripristina l'omeostasi del redox. In linea con tali osservazioni, abbiamo recentemente dimostrato che la secrezione di IL-1, uno dei più importanti mediatori dell'infiammazione, è strettamente regolata dal redox: in particolare, la risposta anti-ossidante è essenzialmente rappresentata da upregolazione di tioredoxina e rilascio extracellulare di cisteina, necessaria per la maturazione e la secrezione della citochina. IL-1beta è fortemente coinvolta in molte malattie legate all'infiammazione, compresa la malattia neoplastica: la presenza di IL-1 nel microambiente tumorale è stata messa in relazione con aggressività e capacità metastatizzante in tumori indotti da carcinogeni chimici. Poiché il redox del microambiente tumorale è fortemente alterato, la definizione dei meccanismi redox che potenziano secrezione e attività di IL-1 è ovviamente di grande rilevanza per lo sviluppo di nuovi farmaci ad attività non solo anti-infiammatoria ma anche anti-neoplastica.

Anche la risposta immune Ag specifica è regolata dal redox. Abbiamo dimostrato alcuni anni fa che i linfociti T resting richiedono una fornitura esterna di cisteina ridotta per potersi attivare e che sono le cellule dendritiche le principali fornitrici di cisteina, che rilasciano attivamente durante la presentazione antigenica. Inoltre, abbiamo osservato in studi in vivo che l'immunizzazione con induzione di risposta immune a livello linfonodale è associata a una forte risposta anti-ossidante, che porta alla generazione di uno stato ridotto nei linfonodi, soprattutto nei centri germinativi dove i linfociti B differenziano a plasmacellule.

La definizione dei meccanismi alla base della risposta anti ossidante in cellule dendritiche e linfociti B e la possibilità di modulare farmacologicamente il redox durante la risposta immune rappresentano un importante traguardo per la messa a punto di un controllo efficace e della risposta immune.

Programmazione 2009-2011

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo generale del progetto è la definizione dei meccanismi alla base della regolazione redox di diversi processi dell'immunità innata e adattativa: 1. processing e secrezione di IL-1beta da parte di monociti stimolati con PAMPs o DAMPs; 2. attivazione dei linfociti T da parte di cellule dendritiche; 3. differenziamento dei linfociti B a plasmacellula. Obiettivo secondario è la messa a punto di approcci farmacologici con farmaci redox-attivi per la modulazione terapeutica della risposta immune.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Il progetto mira all'identificazione di parametri associati allo stato redox che hanno un ruolo chiave nella risposta immune innata e antigene specifica. Questi parametri rappresenteranno ottimi bersagli per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche redox-mirate, atte a controllare la risposta infiammatoria acuta e cronica, e utilizzabili quindi nelle terapie tumorali, a sostegno della chemioterapia.

Descrizione delle attività 2009-2011, con dettaglio delle attività e dei risultati attesi nel primo anno

In questo progetto utilizzeremo 3 diversi sistemi sperimentali: 1. monociti di soggetti sani e di pazienti affetti da malattie autoinfiammatorie caratterizzate da mutazione "gain of function" in geni che controllano il processing di IL-1beta; 2. cellule dendritiche derivate in vitro da monociti del sangue periferico e presentazione antigenica a linfociti T (sistema MLR o presentazione di Ag solubili); 3. linfociti B murini, differenziati in vitro a plasmacellule, e milze e linfonodi ottenuti da topi non immuni o dopo immunizzazione con antigeni.

1. Nel primo sistema sperimentale studieremo la modulazione del redox durante l'esposizione di monociti a diversi PAMPs e il suo ruolo su processing e secrezione di IL-1beta. Inoltre, studieremo la secrezione di IL-1beta in diverse condizioni redox (ottenute mediante composti attivi sul redox o utilizzo di siRNA specifici per varie ossidoreduttasi) e a diverse concentrazioni di ossigeno. In particolare, nel primo anno i seguenti parametri saranno valutati: generazione di ROS e RNS (specie reattive dell'azoto), modulazione del GSH e del trasportatore Xc-, rilascio extracellulare di cisteina, cinetica degli eventi ossidanti e anti-ossidanti, processing e secrezione di IL-1beta in condizioni normossiche o ipossiche.

In seguito, procederemo all'identificazione degli enzimi coinvolti nella risposta anti-ossidante mediante PCR Array specifico per geni della difesa anti-ossidante, validato da real time-PCR e procederemo all'identificazione di farmaci capaci di modulare la secrezione di IL-1beta agendo sul redox.

Poiché abbiamo recentemente dimostrato che monociti stimolati da PAMPs rilasciano ATP, che interagendo sul recettore P2X7 espresso dai monociti innesca maturazione e secrezione di IL-1b, negli anni seguenti investigheremo i meccanismi di rilascio di ATP e la relazione eventuale tra ATP e modulazione del redox. In particolare, analizzeremo in monociti attivati l'espressione dei canali ritenuti responsabili per rilascio di ATP in altri sistemi cellulari (pannexins, connexins, maxi-channels etc) e valuteremo l'effetto del trattamento con inibitori specifici dei diversi canali sul rilascio di ATP indotto dai PAMPs.

2. Nel secondo sistema sperimentale, saranno investigati i meccanismi alla base del rilascio di cisteina da parte delle cellule dendritiche. In dettaglio, le cellule dendritiche saranno portate a maturazione con LPS o trattate con altri PAMPs e DAMPs: i livelli di cisteina rilasciati saranno valutati a vari tempi. Vari inibitori (tra cui Sulfasalazina (SASP), che blocca l'uptake di cisteina, farmaci attivi su tioredoxina come DCNB) saranno testati per identificare possibili farmaci in grado di modulare il rilascio di cisteina. Negli anni seguenti sarà valutato il possibile coinvolgimento dell'ATP endogeno (rilasciato dalle stesse DC e agente sui recettori purinergici da esse espresse) nelle modificazioni del redox cui vanno incontro le DC durante la maturazione. Inoltre, poiché IL-1 è uno dei promotori del differenziamento T verso il fenotipo Th17, e poiché le DC sono state implicate nell'induzione di tale differenziamento, valuteremo sintesi, processing e secrezione di IL-1 da parte di DC esposte a diversi PAMPs e DAMPs, e il ruolo del redox nella secrezione della citochina.

3. Nel terzo sistema sperimentale, valuteremo la modulazione del redox in linfociti B murini naive B esposti a LPS per indurne la maturazione a plasmacellule. In particolare, investigheremo la produzione di ROS. e i diversi tipi di risposta anti-ossidante attivate nei linfociti B durante il differenziamento (modulazione del GSH e del trasportatore Xc-, rilascio extracellulare di cisteina, modulazione di tioredoxina e altri enzimi redox-relati). Inoltre, il blocco farmacologico della produzione di ROS ci permetterà di capire se i ROS indotti dal differenziamento rappresentano un byproduct dovuto all'aumento del lavoro biosintetico dei linfociti B differenzianti, o se giocano un ruolo nella loro maturazione a plasmacellule. Anche per la risposta anti-ossidante valuteremo se ha solo la funzione di ripristinare l'omeostasi del redox o se ha effetti sul processo differenziativo. Metteremo quindi a punti colorazioni specifiche per gruppi SH liberi (Mercury Orange) e per ROS (peroxygreen) su campioni di linfonodi e milze da topi non immuni o immuni, per la valutazione e la localizzazione in vivo dello stato redox.

Track record

Ellerman J.E.-Brown C.-De Vera M.-Zeh H.J.-Billiar T.-Rubartelli A.-Lotze M.T.

Masquerader: high mobility group box-1 and cancer.

Clin. Cancer. Res.13:2836/2848, 2007

Gattorno M.-Tassi S.-Carta S.-Delfino L.-Ferlito F.-Pelagatti M.-D'Ossualdo A.-Buoncompagni A.-Alpigiani M.-Alessio M.-Martini A.-Rubartelli A.

Pattern of interleukin-1beta secretion in response to lipopolysaccharide and ATP before and after interleukin-1 blockade in patients with CIAS1 mutations.

Arthritis Rheum. 56:3138/3148, 2007

Lotze M.T.-Deisseroth A.-Rubartelli A.

Damage associated molecular pattern molecules.

Clin. Immunol.124:1/4, 2007

Programmazione 2009-2011

Lotze M.T.-Zeh H.J.-Rubartelli A.-Sparvero L.J.-Amoscato A.A.-Washburn N.R.-Devera M.-Liang X.-Tör M.-Billiar T.
The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity.
Immunol. Rev. 220:60/81, 2007

Rubartelli A.-Lotze MT.
Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox.
Trends Immunol. 28:429/436, 2007

Castellani P.-Angelini G.-Delfino L.-Matucci A.-Rubartelli A.
The thiol redox state of lymphoid organs is modified by immunization: role of different immune cell populations.
Eur. J. Immunol. 38:2419/2425, 2008

Ceccarelli J.-Delfino L.-Zappia E.-Castellani P.-Borghi M.-Ferrini S.-Tosetti F.-Rubartelli A.
The redox state of the lung cancer microenvironment depends on the levels of thioredoxin expressed by tumor cells and affects tumor progression and response to prooxidants.
Int. J. Cancer 123:1770/1778, 2008

Ferwerda G.-Kramer M.-de Jong D.-Piccini A.-Joosten L.A.-Devesaginer I.-Girardin S.E.-Adema G.J.-van der Meer J.W.-Kullberg B.J.-Rubartelli A.-Netea M.G.
Engagement of NOD2 has a dual effect on proIL-1beta mRNA transcription and secretion of bioactive IL-1beta.
Eur. J. Immunol. 38:184/191, 2008

Gattorno M.-Piccini A.-Lasigliè D.-Tassi S.-Brisca G.-Carta S.-Delfino L.-Ferlito F.-Pelagatti M.A.-Caroli F.-Buoncompagni A.-Viola S.-Loy A.-Sironi M.-Vecchi A.-Ravelli A.-Martini A.-Rubartelli A.
The pattern of response to anti-interleukin-1 treatment distinguishes two subsets of patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis.
Arthritis Rheum. 58:1505/1515, 2008

Piccini A.-Carta S.-Tassi S.-Lasigliè D.-Fossati G.-Rubartelli A.
ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:8067/8072, 2008

Ferwerda G.-Kramer M.-de Jong D.-Piccini A.-Joosten L.A.-Devesaginer I.-Girardin S.E.-Adema G.J.-van der Meer J.W.-Kullberg B.J.-Rubartelli A.-Netea M.G.
Engagement of NOD2 has a dual effect on proIL-1beta mRNA transcription and secretion of bioactive IL-1beta.
Eur. J. Immunol. 38:184/191, 2008

Carta S.-Castellani P.-Delfino L.-Tassi S.-Venè R.-Rubartelli A.
DAMPs and inflammatory processes: the role of redox in the different outcomes.
J. Leukoc. Biol. Epub Jun 29, 2009

Tassi S.-Carta S.-Venè R.-Delfino L.-Ciriolo M.R.-Rubartelli A.
Pathogen-induced interleukin-1beta processing and secretion is regulated by a biphasic redox response.
J. Immunol. 183:1456/1462, 2009

Rubartelli A.-Sitia R.
Stress as an Intercellular Signal: The Emergence of Stress-Associated Molecular Patterns (SAMP).
Antioxid. Redox Signal. Epub Mar 26, 2009

Netea M.G.-Nold Petry C.A.-Nold M.F.-Joosten L.A.-Opitz B.-van der Meer J.H.-van de Veerdonk F.L.-Ferwerda G.-Heinhuis B.-Devesa I.-Funk C.J.-Mason R.J.-Kullberg B.-Rubartelli A.-van der Meer J.W.-Dinarello C.A.
Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages.
Blood 113:2324/2335, 2009

Utilizzo terapeutico di L19TNFalpha in combinazione con L19-IL2 e/o chemioterapici (melphalan, gemcitabina) nel trattamento preclinico di tumori solidi

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: c - Studi preclinici per lo sviluppo di test diagnostici e terapie biologiche antitumorali

Responsabile scientifico: Laura Borsi

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Enrica Balza, Patrizia Castellani, Anna Rubartelli

Anno di inizio: 2009

Programmazione 2009-2011

Durata: 36 mesi

Parole chiave: tumor targeting; immunoterapia; citochine; vaccinazione antitumorale

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Immunologia (B. Carnemolla)

Altri Enti coinvolti: Università dell'Insubria, Varese (L. Mortara, R. Accolla)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Istituto Superiore Sanità; Ministero della Salute; Alleanza contro il Cancro

Background

L19mTNFalpha è una proteina di fusione formata dall'anticorpo ricombinante L19, specifico per il dominio oncofetale ED-B della fibronectina (un marker di angiogenesi - Castellani et al., Int J Cancer. 1994), e dalla citochina tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha). Sebbene il TNFalpha sia una delle più potenti citochine antitumorali, i suoi inaccettabili effetti collaterali ne hanno precluso la somministrazione sistemica a dosi terapeuticamente efficaci e, ad oggi, l'utilizzo clinico di TNFalpha è limitato a somministrazioni loco-regionali, in combinazione al melphalan, quali la "isolated limb perfusion" (ILP) nel trattamento di sarcomi e melanomi di alto grado e non trattabili chirurgicamente. L19mTNFalpha umano è entrato nel corso del 2008 in trials clinici di fase I/II. Iniettata endovena la proteina L19mTNFalpha esercita un'attività terapeutica almeno 4 volte superiore rispetto alle molecole di controllo (Borsi et al, Blood, 2003). Questo risultato è dovuto all'accumulo selettivo a livello dei vasi del tumore.

L'utilizzo di L19mTNFalpha in combinazione con il chemioterapico melphalan nel topo con tumore indotto sottocute (s.c.) determina guarigione in alte percentuali di animali dovuta a necrosi tumorale (che supera l'80% nei giorni immediatamente successivi al trattamento) ma soprattutto per la potente risposta immunitaria T cellulo-mediata verso tumori omologhi ed anche eterologhi. I meccanismi immunologici innescati con L19mTNFalpha/melphalan e che sono alla base del rigetto dei tumori sono stati chiariti in due modelli di tumore murino, C51 colon carcinoma e WEHI-164 fibrosarcoma (Balza et al, Clin. Cancer Res., 2006; Mortara et al, Eur. J Immunol, 2007). È emerso che le cellule T, sia CD4+ (con risposta mista Th1/Th2) che CD8+ (effettori antitumorali finali), sono essenziali per l'efficacia antitumorale del trattamento con L19mTNFalpha/melphalan sia nella fase di priming che effettrice e di memoria immunologica che, in vivo, persiste almeno fino a 10 mesi dalla cura. L'analisi immunostochimica del tumore dopo la terapia e durante la fase di rigetto mostra un precoce infiltrato tumorale dei T linfociti CD4+ e CD8+ in numero significativamente elevato rispetto ai controlli. Inoltre, nei linfonodi drenanti il tumore di topi trattati con L19mTNFalpha/melphalan si assiste a rapida e persistente diminuzione del numero, ma non della funzione, delle cellule CD4+CD25+ T regolatorie. La terapia con L19mTNFalpha/melphalan, estesa all'osteosarcoma K7M2 ha guarito il 20% degli animali trattati. Altre combinazioni terapeutiche con L19mTNFalpha sono state utilizzate. Fra queste la combinazione con gemcitabina (analogo di nucleoside ampiamente usato in clinica), descritta ridurre il numero delle mieloidi soppressorie Gr1+CD11b+ in animali con tumore (Suzuki E. et al, Clin Cancer Res., 2005), ha dato buoni risultati in termini di guarigione da tumore (WEHI-164, fino all'80% dei topi trattati) e successivo rigetto di tumore omologo. Inoltre, anche la combinazione di L19mTNFalpha e L19-IL2 (Carnemolla et al, Blood, 2002), è risultata efficace in casi di neuroblastoma murino (N2A) con circa il 70% di guarigioni complete, seguite da rigetto di tumore. Come nella combinazione con melphalan, anche in questi casi si è dimostrata necrosi tumorale di alto grado successiva ai trattamenti, accompagnata dall'instaurarsi di memoria immunitaria antitumore T cellulo-mediata. In sostanza, l'utilizzo di L19mTNFalpha, in varie combinazioni sinergiche, può determinare, in significative % di topi con tumore misurabile, regressione totale del tumore e vaccinazione antitumore.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Immediato beneficiario è il sistema sanitario, poiché L19mTNFalpha è entrata nel 2008 in trials clinici di fase I-II.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Il progetto ha lo scopo di valutare la possibilità di ottenere vaccinazione terapeutica antitumorale utilizzando L19mTNFalpha in combinazione a melphalan, a L19-IL2 (anch'essa già entrata in trials clinici di fase I/II) e a gemcitabina in diversi modelli di tumore murino.

Per fare questo utilizzeremo gruppi di topi con tumore singenico (fibrosarcoma WEHI-164, colon carcinoma C51 e osteosarcoma K7M2 in topi Balb/C; neuroblastoma N2A in topi A/J).

Gli animali saranno trattati, quando il tumore raggiunge 0.1-0.2 cm³, con protocolli di terapia sistemica già utilizzati in laboratorio (Borsi et al, Blood. 2003; Balza et al, Clin.Cancer Res., 2006; Mortara et al, Eur. J Immunol, 2007) e comprendenti L19mTNFalpha (0.7 pmol/g; singola i.v. inj.), melphalan (90 microgrammi/topo; singola i.p. inj., 24h dopo L19mTNFalpha), L19-IL2 (20-40 microgrammi/topo; 1 i.v. inj. al giorno, per 5 giorni) e gemcitabina (2 mg/topo; 1 i.p. inj a settimana, per 2 settimane) in varie combinazioni.

Valuteremo a vari tempi dal trattamento il volume dei tumori, l'entità della necrosi, l'infiltrazione tumorale di cellule infiammatorie e immunitarie (tecniche di immunostochimica). Valuteremo inoltre la modulazione delle cellule mieloidi soppressorie (Gr1+CD11b+) e T regolatorie (CD4+CD25+) nei tessuti linfoidi secondari (milza e linfonodi drenanti) (immunofluorescenza ed analisi citofluorimetrica) e la loro attività biologica (produzione di ROS, test di inibizione di proliferazione).

Per stabilire il contributo precoce di distinte popolazioni linfocitarie nei processi di cura, i diversi protocolli terapeutici saranno applicati anche a gruppi di topi con tumore depletati in vivo di cellule T CD4+ e CD8+, o di cellule NK.

Per stabilire inoltre il contributo di specifiche sottopopolazioni cellulari nel rigetto del tumore, saranno allestiti esperimenti di transfer di immunità. In questi esperimenti sarà valutata in topi naive la protezione contro il tumore esercitata dagli splenociti derivati da topi guariti (totali o come popolazioni selezionate, CD4+, CD8+, NK).

Programmazione 2009-2011

Alla fine del 2009 prevediamo di aver completato gli esperimenti preclinici di terapia con i vari trattamenti nei quattro modelli di tumore singenico, sia in topi immunocompetenti che depletati di cellule T CD8+, CD4+, ed NK e di aver verificato la trasferibilità di protezione nei confronti di tumori a topi naive utilizzando splenociti prelevati da topi guariti.

Track record

Balza E.-Mortara L.-Sassi F.-Monteghirfo S.-Carnemolla B.-Castellani P.-Neri D.-Accolla RS.-Zardi L.-Borsi L.
Targeted delivery of tumor necrosis factor-alpha to tumor vessels induces a therapeutic T cell-mediated immune response that protects the host against syngeneic tumors of different histologic origin.
Clin. Cancer Res. 12(8):2575/2582, 2006

Mortara L.-Balza E.-Sassi F.-Castellani P.-Carnemolla B.-De Lerma Barbaro A.-Fossati S.-Tosi G.-Accolla RS.-Borsi L.
Therapy-induced antitumor vaccination by targeting tumor necrosis factor alpha to tumor vessels in combination with melphalan.
Eur. J. Immunol. 37(12):3381/3392, 2007