

s.s. Embriogenesi e tumorigenesi su modelli animali

Cellule Staminali Tumorali Mammarie: identificazione, isolamento e loro caratterizzazione

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: a - Ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica

Responsabile scientifico: Simonetta Astigiano

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Ottavia Barbieri, Patrizia Damonte

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: neoplasie mammarie; cellule staminali; terapie targets

Altri Enti coinvolti: CNR, Milano (I. Zucchi); Istituto Oncologico Veneto, Padova (V. Bronte)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: DIMES, Università di Genova

Background

Il tumore mammario rappresenta la causa di morte più comune tra le donne affette da neoplasia. Il lungo lasso di tempo che intercorre nel carcinoma della mammella prima che la sopravvivenza raggiunga il plateau suggerisce il coinvolgimento di una popolazione cellulare capace di resistere ai trattamenti e di sfuggire ai controlli per lungo tempo. Queste cellule, denominate cellule staminali tumorali (CSC), rappresentano una rara sottopopolazione della massa tumorale ed hanno diverse caratteristiche in comune con le cellule staminali somatiche (SC) responsabili del mantenimento della omeostasi tissutale virtualmente di tutti gli organi. Le proprietà che caratterizzano le SC sono la capacità di autorinnovarsi e la pluripotenzialità. Infatti, le SC identificate nella ghiandola mammaria murina mostrano la capacità di generare le tre linee che concorrono a formare le strutture lobulo-alveolari della ghiandola adulta (mioepitelio, epitelio duttale ed epitelio alveolare), e possono essere mantenute attraverso trapianti seriali in vivo. Le SC sono anche caratterizzate da un basso tasso di replicazione e occupano nicchie ambientali particolarmente ipossiche, per cui hanno una lunga sopravvivenza. Questo aumenta la probabilità che, nel corso della vita, accumulino lesioni geniche che possono portare alla loro trasformazione neoplastica. Recentemente, su alcuni modelli murini, è stato identificato un nuovo tipo di SC, le cellule staminali pre-neoplastiche (pCSC). Queste rappresentano uno stadio intermedio ed hanno, infatti, caratteristiche sia delle SC che delle CSC. La scoperta delle pCSC permette quindi di ricostruire l'intero processo di sviluppo neoplastico: SC somatiche accumulano mutazioni che ne inducono la trasformazione conducendo alla formazione di lesioni preneoplastiche, che poi possono progredire a tumori invasivi e metastatici, sede delle CSC. Molti tumori umani, tra cui il mammario, mostrano questo tipo di evoluzione, per cui l'isolamento e la caratterizzazione di pCSC, e la valutazione di differenze e similitudini con le SC e CSC potrebbe essere fondamentale per comprendere la formazione e lo sviluppo dei tumori ed identificare nuovi bersagli molecolari. Inoltre, le CSC sono resistenti alle chemio e radioterapie convenzionali, e poiché è stato sperimentalmente dimostrato che una sola CSC è sufficiente a rigenerare il tumore, ponendo le basi per la recidiva, il targeting delle CSC sarebbe una strategia verosimilmente efficace per il trattamento dei tumori, sia primitivi che metastatici. Nel carcinoma della mammella però una precisa conoscenza delle caratteristiche di queste cellule non è ancora stata raggiunta, e il potenziale terapeutico di trattamenti anti CSC rimane ancora da valutare.

Il nostro gruppo ha una lunga esperienza nella messa a punto, nello studio e nella manipolazione di modelli murini di patologie umane, inoltre abbiamo in corso da alcuni anni una fruttuosa collaborazione con il gruppo della Dr.ssa Zucchi (ITB-CNR di Milano), partecipando alla caratterizzazione delle cellule LA7, un clone derivato dalla linea di tumore mammario del ratto Rama-25, come linea costituita da CSC. Oltre a ciò abbiamo iniziato una collaborazione con il gruppo del Dr. Cardiff (UC-Davis, California) sull'isolamento e caratterizzazione di SC da lesioni pre-neoplastiche.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo principale del progetto è quello di identificare, isolare e caratterizzare cellule staminali da tessuto mammario normale, pre-neoplastico e neoplastico, con lo scopo di identificare nuovi targets terapeutici e di ottenere modelli per la sperimentazione di terapie mirate.

Obiettivo secondario è l'implementazione delle conoscenze nel campo delle staminali tumorali e la stabilizzazione di modelli murini utilizzabili in studi preclinici.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Non vi sarà un impatto assistenziale certo, ma potenzialmente potremo individuare nuove terapie mirate all'eradicazione delle CSC.

Risultati e prodotti 2010

Nel corso del 2010 abbiamo ricevuto un numero molto limitato di campioni di tumore mammario umano che, impiantati nel pannicolo adiposo mammario di topi femmina immunodepressi, non hanno dato origine a tumori.

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Abbiamo quindi continuato a lavorare sul modello murino dei topi MMTV Neu./GFP che sviluppano tumori istologicamente identici a quelli del ceppo originario con un'alta percentuale (95%) di cellule fluorescenti. Dai tumori abbiamo separato, tramite cell sorter, cellule GFP+ e positive alla colorazione con PKH26, un colorante vitale la cui ritenzione è indicata come marcatore di staminalità.. Le cellule sono poi state piastrate in sospensione per valutare la formazione di mammosfere.

Per quanto riguarda l'influenza di gravidanze ripetute sulla presenza di cellule staminali in ghiandole mammarie normali, abbiamo valutato tramite FACS i marcatori di staminalità CD24, CD29 e CD49f comparando femmine della stessa età vergini, dopo una gravidanza o dopo 4 gravidanze. I dati fino ad ora ottenuti indicano che, mentre non vi sono differenze significative tra femmine vergini e femmine che hanno avuto una sola gravidanza, le gravidanze multiple hanno prodotto un aumento della popolazione staminale (CD24low/CD29high)

Abbiamo inoltre continuato la collaborazione con la Dott.ssa Zucchi del CNR di Milano sulla caratterizzazione del gene Rat8, della linea di tumore mammario ratto 106 e di alcuni miR presumibilmente coinvolti nel differenziamento o nella metastatizzazione.

Oltre al progetto descritto abbiamo partecipato ad altri lavori di collaborazione che hanno prodotto pubblicazioni.

Pubblicazioni

Lipnik K.-Naschberger E.-Gonin-Laurent N.-Kodajova P.-Petznek H.-Rungaldier S.-Astigiano S.-Ferrini S.-Stürzl M.-Hohenadl C.

Interferon gamma-induced human guanylate binding protein 1 inhibits mammary tumor growth in mice.
Mol Med. 16:177/87, 2010

Morini M.-Astigiano S.-Gitton Y.-Emionite L.-Mirisola V.-Levi G.-Barbieri O.

Mutually exclusive expression of DLX2 and DLX5/6 is associated with the metastatic potential of the human breast cancer cell line MDA-MB-231.
BMC Cancer 10:649, 2010

Vieux-Rochas M.-Mantero S.-Heude E.-Barbieri O.-Astigiano S.-Couly G.-Kurihara H.-Levi G.-Merlo GR.

Spatio-temporal dynamics of gene expression of the Edn1-Dlx5/6 pathway during development of the lower jaw.
Genesis 48:262/373, 2010

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Lo studio sulle staminali tumorali mammarie umane è purtroppo fortemente rallentato dalle grosse difficoltà nel reperire il materiale. Se ci verranno forniti campioni vorremmo continuare i tentativi di isolamento delle staminali e ci siamo poste come obiettivo il raggiungimento di 60 campioni processati. Ciò che intendiamo fare è prelevare frammenti di tumore ed impiantarli direttamente nel pannicolo adiposo di topi femmina, preparato tramite rimozione del tessuto epiteliale endogeno ed inoculo di fibroblasti umani. Le eventuali crescite potranno poi essere usate come materiale per l'isolamento delle staminali tumorali.

Continueremo invece sicuramente l'isolamento e l'analisi delle cellule staminali mammarie di tumori da topi FVBNeu. Abbiamo diversi campioni conservati in azoto liquido in attesa di avere un numero sufficiente di cellule per poter effettuare trattamenti farmacologici sia con chemioterapici convenzionali che con molecole innovative. Il lavoro portato avanti sui topi FVBNeu si allaccia anche al secondo progetto della nostra struttura (resp. scientifico Dott.ssa Ottavia Barbieri) in cui valuteremo la possibilità che in un topo transgenico da noi prodotto (Arg1/Neu) si verifichi un'espansione del compartimento di cellule staminali tumorali dovuto ad un cambio nel microambiente mammario prodotto dall'espressione del transgene. Al momento abbiamo dati preliminari che sembrano confermare questa ipotesi.

Porteremo a termine l'analisi della popolazione staminale in ghiandole mammarie murine di femmine vergini e dopo uno o più parti. I dati raccolti fino ad ora indicano che l'effettuazione di parti multipli aumenta la percentuale di staminali mammarie. Questo è propedeutico alla valutazione di eventuali cambiamenti nella suscettibilità all'induzione di tumori mammari da cancerogeni chimici.

Continuerà certamente la collaborazione con la Dott.ssa Zucchi con cui stiamo ora valutando l'effetto di alcuni geni e miR sul potenziale tumorigenico e differenziativo della linea di staminali tumorali mammarie di ratto LA7. Attualmente stiamo portando a termine l'analisi di cloni cellulari derivati da questa linea potenzialmente metastatici.

Ruolo dell'Arginasi 1 nel microambiente tumorale

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: a - Ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica

Responsabile scientifico: Ottavia Barbieri

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Simonetta Astigiano

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: arginasi 1; immunosoppressione; granulociti; linfociti T; animali transgenici; NSCLC

Altre strutture IST partecipanti: s.c. Terapia immunologica (S. Ferrini)

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Altri Enti coinvolti: Istituto Oncologico Veneto, Padova (V. Bronte)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Association for International Cancer Research, UK

Background

I tumori sono in grado di mettere in atto numerose strategie per sottrarsi al controllo del sistema immunitario. Una delle strategie più efficaci sembra essere legata all'espressione, a livello del microambiente tumorale, dell'Arginasi (ARG), un enzima che catabolizza l'Arginina ad Ornitina ed Urea. Una marcata riduzione della concentrazione di L-arginina nel microambiente extracellulare si traduce in una drastica downregolazione dell'espressione della catena z del CD3 dei linfociti T. Il triggering del complesso CD3/TCR, in presenza di attività arginasi risulta quindi in un blocco proliferativo e nell'instaurarsi di una condizione di energia che in ultimo può condurre a morte cellulare. Un analogo effetto di blocco proliferativo viene esercitato anche sulle cellule NK. L'effetto immunosoppressivo dell'ARG viene amplificato dalla concomitante espressione della sintetasi ossido nitrica (NOS). In presenza dei due enzimi, infatti viene ad essere prodotto perossinitrito, che va a nitrosilare i residui tirosinici. Una Tiroxina nitrosilata non è in grado di essere fosforilata e quindi di trasdurre il segnale. L'effetto finale a carico della risposta immune consiste in una rapida apoptosi di quei linfociti T che abbiano ricevuto un segnale di attivazione. Nell'uomo questo meccanismo sembra essere alla base dell'immunosoppressione locale nel tumore della prostata.

Esistono due diverse isoforme di ARG, espresse da differenti tipi cellulari: ARG1 e ARG2. Nell'uomo il ruolo di ARG1 è ancora poco conosciuto: escludendo gli epatociti l'enzima è espresso solo dai polimorfonucleati neutrofili (PMN), in cui è localizzato in forma inattiva all'interno dei granuli di gelatinasi. E' evidente che in questa forma non può agire sul catabolismo dell'Arginina, tuttavia è stato osservato che l'enzima rilasciato a seguito di lisi dei PMN è attivo ed è responsabile dell'attività immunosoppressiva associata a raccolte purulente. Non è noto, viceversa se l'enzima possa essere esocitato in forma attiva da PMN viabili, e quali stimoli possano indurre il fenomeno. In studi preliminari sul carcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC) abbiamo riscontrato che i PMN reclutati all'interno del NSCLC hanno un contenuto in ARG1 ridotto rispetto alle stesse cellule nei vasi o a quei PMN che infiltrano il tessuto polmonare normale; questo suggerisce che i PMN infiltranti il NSCLC possano andare incontro all'esocitosi dei granuli contenenti ARG1. Se tale enzima è in forma attiva questo potrebbe contribuire a spiegare il fatto che i linfociti infiltranti il NSCLC sono anergici. Dato poi che i PMN sono presenti in quantità nel microambiente infiammatorio dei tumori umani, è possibile che essi contribuiscano all'immunosoppressione locale anche in altri tipi di tumore.

Nei topi ARG1 è espressa principalmente dalle cosiddette cellule mieloidi soppressore (MSC) infiltranti il tumore e può essere indotta da vari fattori presenti nel microambiente tumorale come citochine, ipossia, cAMP e prostaglandine; va osservato che in modelli di tumori murini il blocco farmacologico dell'attività di ARG1 può ripristinare la risposta immunitaria anti tumore ed indurre la regressione della neoplasia.

L'isoforma ARG2 nell'uomo è espressa costitutivamente dalle cellule di alcuni tumori solidi, ma ciò non implica che l'enzima abbia un ruolo di rilievo nell'immuno-evasione tumorale. Occorre infatti che l'enzima sia espresso a livelli tali da indurre l'effettiva deplezione di L-arginina nell'ambiente extracellulare. Noi abbiamo dimostrato che nel NSCLC ciò non avviene, sebbene le cellule tumorali possano esprimere costitutivamente ARG2. Il panorama muterebbe però se all'azione dell'ARG2 si sommasse quella dell'ARG1 espressa dai PMN infiltranti il tumore.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo principale del presente progetto è quello di investigare i meccanismi di azione e di regolazione dell'ARG1 nei tumori solidi dell'uomo, nel valutarne il ruolo nell'escape immunitario e nella progressione del tumore, e infine nell'identificare possibili approcci terapeutici mirati alla soppressione dell'attività arginasi.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Sviluppo potenziale di terapie tumorali anti immunosoppressore.

Risultati e prodotti 2010

In questo secondo anno di progetto abbiamo studiato a fondo il fenotipo derivante dagli effetti della sovraespressione di Arginasi 1 (ARG1), l'enzima che metabolizza la L-Arginina ad Ornitina ed Urea, nel modello doppio transgenico da noi prodotto (MMTV-neu/CD68-Arg1). In questo modello l'enzima è espresso costitutivamente nei macrofagi infiltranti il tumore mammario che si forma spontaneamente per sovraespressione dell'oncogene neu. Con lo scopo di studiare se la sovraespressione di ARG1 possa essere coinvolta nella progressione neoplastica e favorire la formazione delle metastasi, abbiamo analizzato i cambiamenti nella latenza ed incidenza dei tumori mammari rispetto ai topi omozigoti esprimenti il singolo transgene neu. Abbiamo esaminato femmine omozigoti per il transgene neu ed eterozigoti per Arg1. Una corte di 16 femmine doppie transgeniche sacrificate a 7 mesi d'età è stata comparata con altrettante femmine neu+/+ in termini di latenza, numero di noduli per animale e metastasi polmonari. Per tutti questi parametri abbiamo riscontrato un netto incremento della progressione neoplastica nei topi portatori di Arg1. Inoltre, analisi delle ghiandole mammarie di queste femmine con colorazioni in whole mount, hanno evidenziato un incremento dell'iperplasia mammaria ed una molteplicità di comparsa di noduli nei topi doppi transgenici rispetto ai topi neu+/+.

Per analizzare un po' più nel dettaglio gli effetti di ARG1 sulla progressione neoplastica abbiamo fatto esperimenti di backcross trapiantando dei tumori mammari derivanti dalla linea MMTV-neu sia su topi transgenici per ARG1 sia su topi FVB wild type e altresì trapiantando dei tumori mammari derivanti dalla linea MMTV-neu e dalla linea MMTV-neu/CD68-Arg1 in topi FVB wild type. I nostri dati indicano che l'accelerazione della comparsa dei tumori è dovuta all'effetto dell'ARG1 sia sul microambiente tumorale del pannicolo adiposo, sia direttamente sulle cellule neoplastiche. I nostri risultati suggeriscono che la deplezione di L-Arginina nell'ambiente tumorale favorisce la crescita dei tumori mammari neu+, evidenziando quindi un ruolo specifico di ARG1 nella progressione di questo tipo di tumore.

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Pubblicazioni

Martini M.-Testi MG.-Pasetto M.-Picchio MC.-Innamorati G.-Mazzocco M.-Ugel S.-Cingarlini S.-Bronte V.-Zanovello P.-Krampera M.-Mosna F.-Cestari T.-Riviera AP.-Brutti N.-Barbieri O.-Matera L.-Tridente G.-Colombatti M.-Sartoris S.
IFN-gamma-mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer.
Vaccine 28: 3548/57, 2010

Rotondo R.-Bertolotto M.-Barisione G.-Astigiano S.-Ferrini S.-Otonello L.-Dallegrì, F.-Bronte V.-Barbieri O.
Exocytosis of azurophil and arginase 1-containing granules by activated polymorphonuclear neutrophils is required to inhibit T lymphocyte proliferation.
J. Leuk. Biol., in press

Presentazioni a congressi

Astigiano S.-Morini M.-De Lerma Barbaro A.-Damonte P.-Bronte V.-Barbieri O.
L-arginine depletion in the tumor microenvironment promotes mammary tumorigenesis.
52° Annual Meeting of the Italian Cancer Society, Rome, October 4-7, 2010

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Avendo evidenziato che nel nostro modello murino ARG1 promuove la progressione del tumore mammario, dobbiamo ora stabilire quanto questo effetto sia imputabile ad un'azione indiretta dell'espressione costitutiva di questo enzima sul microambiente tumorale o ad un'azione diretta sulle cellule neoplastiche. Ovvero quanto ARG1 agisca inducendo immunotolleranza, o inducendo le cellule neoplastiche a proliferare maggiormente, attraverso ad esempio l'azione delle poliamine. Durante questo anno di lavoro quindi completeremo la caratterizzazione fenotipica dei tumori mammari insorti nei topi singoli e doppi transgenici per ARG1 e ne tramite analisi di immunistoichimica per l'espressione di AU-tag, Arg1 e CD-68. Per rispondere alle nostre domande, e confermare il ruolo di ARG1 nell'indurre la proliferazione neoplastica delle cellule del tumore mammario, trapianteremo nella ghiandola mammaria di topi transgenici per MMTV-neu rispettivamente macrofagi peritoneali isolati dal nostro topo transgenico che esprimono costitutivamente ARG1, o macrofagi derivati da topi wild type. Inoltre, tratteremo topi sia doppi che singoli transgenici con 2-difluorometilornitina (DMFO) un inibitore biosintetico dell'ornitina decarbossilasi. Lo stesso trattamento ed il trattamento con un inibitore specifico dell'Arginasi, S-(2-boronoetil)-L-cisteine (BEC) sarà effettuato sui topi FVB wild type trapiantati con cellule tumorali derivanti da topi sia doppi che singoli transgenici. Infine per determinare se la sovraespressione di ARG1 nella ghiandola mammaria contribuisce alla progressione neoplastica favorendo l'espansione delle cellule staminali presenti, analizzeremo tramite citofluorimetria la popolazione cellulare presente nella ghiandola mammaria di topi doppi o singoli transgenici, sia prima che dopo la comparsa del tumore, con marcatori specifici per il compartimento staminale (CD24, CD29, ALDH CD133, p63, p21) e valuteremo le differenze nella loro capacità di formare mammosfere in vitro.