

s.s. Immunoterapia cellulare personalizzata

Analisi delle interazioni recettore/ligando che regolano l'attività anti-tumorale dei linfociti NK

Linea di ricerca: 2 – Interazioni Tumore-Ospite

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

Responsabile scientifico: Daniela Pende

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Raffaella Meazza

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: linfociti NK; recettori attivatori; ligandi; marcatori tumorali; leucemie

Altre strutture IST partecipanti: s.c. Immunologia (M.C. Mingari, S. Martini, S. Marcenaro, C. Tuberosa); s.c. Oncologia medica C (M. Ferrarini)

Altri Enti coinvolti: IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia (F. Locatelli); Istituto G. Gaslini, Genova (L. Moretta, C. Cantoni, E. Lanino); Università degli Studi di Genova (A. Moretta); Università di Catanzaro (E. Carbone)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute

Background

In seguito a trasformazione neoplastica, le cellule sovraesprimono molecole inducibili da stress, che possono rappresentare ligandi per recettori immunitari. Questo è stato dimostrato per le molecole MICA e ULBP, che sono ligandi di NKG2D, un recettore attivatorio espresso da linfociti NK e CTL. Nel nostro gruppo abbiamo dimostrato che CD155 e CD112 sono i ligandi di DNAM-1, un recettore attivatorio espresso da linfociti NK e T. Grazie a una serie di anticorpi monoclonali, prodotti anche dal mio gruppo di ricerca, abbiamo potuto studiare la regolazione della suscettibilità alla lisi NK di diverse cellule tumorali, sia linee tumorali di diverso istotipo sia cellule tumorali fresche, quali leucemie acute, neuroblastomi e mieloma multiplo. Abbiamo analizzato un pannello di leucemie acute mieloidi (AML) e linfoblastiche (ALL) per l'espressione di queste molecole descrivendo pattern diversi a seconda del tipo di leucemia. I blasti leucemici Nectina-2/PVR⁺ erano chiaramente distinguibili fenotipicamente dalle cellule normali, dal momento che i linfociti sono sempre negativi per queste molecole. Rilevante è che abbiamo potuto correlare l'espressione in superficie di PVR e Nectina-2 sulle leucemie con un ruolo di DNAM-1 nell'indurre la loro lisi. Di conseguenza queste molecole rappresentano importanti marcatori funzionali. Recettori NK specifici che giocano un ruolo di primo piano nell'uccisione di cellule tumorali sono gli NCR (NKp46, NKp30 e NKp44). I ligandi tumorali di questi recettori sono ancora elusivi. Molto recentemente è stato descritto che un ligando di NKp30 è B7H6, che è espresso sulla membrana di diverse linee tumorali mentre è assente su cellule normali. L'espressione di B7H6, che correla con il binding di NKp30-Fc, è stata anche riscontrata su alcune neoplasie ematologiche alla diagnosi.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo generale del progetto consiste nell'applicare le nostre acquisizioni sulle interazioni recettore-ligando che regolano la citotossicità NK nei confronti di cellule tumorali per compiere una ricerca traslazionale, soprattutto nell'ambito delle neoplasie ematologiche. Le cellule tumorali verranno caratterizzate fenotipicamente valutando l'espressione di molecole che vengono up-regolate in seguito a trasformazione neoplastica e rappresentano ligandi dei recettori attivatori NK: MICA e ULBPs (i ligandi di NKG2D), e PVR e Nectina-2 (i ligandi di DNAM-1). Inoltre, tramite la produzione di anticorpi monoclonali, cercheremo di identificare nuovi marcatori di cellule tumorali, in particolare molecole funzionalmente rilevanti, quali nuovi ligandi di recettori attivatori dei linfociti NK. Di particolare interesse sono i ligandi degli NCR, che rappresentano recettori NK specifici cruciali nell'induzione della lisi della maggioranza delle cellule tumorali, tra cui anche le leucemie. Dal momento che è stato recentemente descritto che B7H6 è un ligando di NKp30 ed è espresso su diverse linee tumorali e anche su alcuni blasti leucemici, cercheremo di produrre anti-B7H6 mAb, immunizzando topi con appropriate linee tumorali descritte B7H6⁺. Come metodo di screening potrà essere utilizzato il trasfettante BW-B7H6, che sta cercando di ottenere la Dott.ssa C. Cantoni, con cui collaboriamo. In attesa di un mAb specifico, potremo valutare l'espressione di ligando di NKp30 tramite la molecola di fusione NKp30-Fc. Abbiamo lo scopo di studiare l'espressione di tutte queste molecole, ligandi di recettori attivatori NK, su un ampio pannello di leucemie, non solo ALL ma anche B-CLL, così come su linfomi a basso grado per meglio definire il loro valore diagnostico e prognostico. Confronteremo blasti leucemici all'esordio e alla ricaduta circa il pattern fenotipico e la suscettibilità alla lisi NK, per capire se avvengono dei processi di immunoselezione e meccanismi di escape immunologico, anche in seguito a trapianto di cellule staminali emopoietiche da donatore allogenico.

Impatto assistenziale certo o potenziale

La ricaduta di queste ricerche in campo clinico-assistenziale è sicuramente di grande impatto, in quanto rientrano in una diagnostica avanzata e la nostra collaborazione con i clinici, specialmente nell'ambito dell'onco-ematologia, è

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

intensa e costante. Abbiamo a disposizione anticorpi monoclonali, da noi prodotti, che possono avere una valenza diagnostica e prognostica nella classificazione di leucemie.

Risultati e prodotti 2010

Sono stati conclusi e pubblicati due studi sugli effetti dell'infezione da citomegalovirus umano (HCMV) sul sistema immunitario in particolare le cellule NK e le dendritiche (DC), in collaborazione con il gruppo d'Immunologia dell'Università di Barcellona diretto da M. Lopez-Botet.

In un primo studio (Muntasell A. et al., Blood 2010) è stata osservata una significativa, selettiva e transitoria riduzione dell'espressione di NKG2D sulle cellule NK durante infezione da HCMV delle cellule mononucleate del sangue periferico. La riduzione di NKG2D era altamente selettiva perché altri recettori NK (i.e. NKp30, NKp46 e CD16) erano preservati sia come espressione che come funzione. Con esperimenti in cui sono state antagonizzate delle citochine oppure utilizzate citochine ricombinanti è stato dimostrato che interferone di tipo I e IL-12 hanno un ruolo diretto nel regolare l'espressione in superficie di NKG2D sulle cellule NK. La down-regolazione di NKG2D inibiva selettivamente la citotossicità NK contro cellule esprimenti ligandi di NKG2D ma preservando la risposta stimolata da altri recettori attivatori. Si potrebbe quindi osservare una diminuita capacità delle cellule NK di uccidere cellule tumorali positive per MICA e/o ULBP. D'altro canto la regolazione citochino-mediata di espressione di NKG2D può rappresentare un meccanismo fisiologico per attenuare la reattività NK contro cellule normali bystander che possono esprimere ligandi di NKG2D lungo il corso di risposte infiammatorie.

In un secondo studio (Magri G. et al., Blood 2010 pre-published) sono state messe a punto le condizioni sperimentali per caratterizzare la risposta NK a DC infettate da HCMV. L'infezione di DC, derivate da monociti, con lo strain di HCMV TB40/E determinava una down-regolazione delle molecole di HLA classe I e attivava specificamente cellule NK autologhe. Riguardo invece l'espressione dei ligandi dei recettori attivatori sulle DC infettate, gli NKG2D-L erano virtualmente assenti, mentre l'interazione di DNAM-1 con i suoi ligandi (i.e. PVR e Nectina-2) sembrava rilevante per la risposta NK a 48h post-infezione; a tempi maggiori si osservava una down-regolazione di DNAM-1-L.

I risultati ottenuti rappresentano un importante progresso nelle conoscenze sulle fondamentali interazioni recettore-ligando coinvolte nella risposta NK contro cellule infettate da HCMV, stressando l'importanza delle dinamiche dei meccanismi di immuno-evasione virale. E' da segnalare che riattivazione di HCMV si riscontra spesso in pazienti leucemici nelle fasi post-trapianto, che noi seguiamo come ricostituzione immunologica e attività NK anti-leucemica (Moretta L. et al., Blood 2010).

Pubblicazioni

Muntasell A.-Magri G.-Pende D.-Angulo A.-Lopez Botet M.

Inhibition of NKG2D expression in NK cells by cytokines secreted in response to human cytomegalovirus infection. Blood 115(25):5170/5179, 2010

Magri G.-Muntasell A.-Romo N.-Saez Borderias A.-Pende D.-Geraghty D.-Hengel H.-Angulo A.-Moretta A.-Lopez Botet M.

NKp46 and DNAM/1 NK cell receptors drive the response to human cytomegalovirus infected myeloid dendritic cells overcoming viral immune evasion strategies. Blood Epub Oct 28, 2010

Moretta L.-Locatelli F.-Pende D.-Marcenaro E.-Mingari M.C.-Moretta A.

Killer Ig like receptor mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. Blood Epub Oct 1, 2010

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Verrà studiata nei pazienti leucemici a diversi tempi post-trapianto la ricostituzione immunologica dei vari subset linfocitari, di cui le NK saranno analizzate per l'espressione dei recettori attivatori e dei recettori HLA-specifici. In base alle nozioni acquisite dagli studi in vitro sulle modifiche fenotipiche e funzionali delle cellule NK in seguito ad infezione con HCMV, verrà in particolare studiata la densità di membrana di recettori attivatori quali NKG2D, che ci si potrebbe aspettare che venga down-regolato, in parallelo ad altri recettori quali DNAM-1, NCR e 2B4. Saranno fatte analisi funzionali per valutare eventuali deficit nella capacità litica nei confronti di target tumorali tra cui la leucemia stessa del paziente pre-trapianto.

L'analisi di espressione dei diversi ligandi per i vari recettori attivatori NK come anche delle molecole di HLA-classe I su cellule tumorali verrà in particolare studiata comparando blasti leucemici alla diagnosi e alla recidiva, eventualmente pre- o post-trapianto di cellule staminali emopoietiche. Nel caso si osservino delle modificazioni del pattern di espressione molecolare, verrà valutato se si possa ipotizzare l'intervento di un'immuno-selezione NK-mediata e meccanismi di escape.

Modelli diagnostici e terapeutici basati sulle cellule NK per il trattamento di neoplasie ematologiche

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

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

Responsabile scientifico: Daniela Pende

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Raffaella Meazza

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: linfociti NK; KIR; recettori attivatori; ligandi; leucemie; linfomi

Altre strutture IST partecipanti: s.c. Immunologia (M.C. Mingari, S. Martini, S. Marcenaro, C. Tuberosa)

Altri Enti coinvolti: IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia (F. Locatelli); Istituto G. Gaslini, Genova (L. Moretta, M. Falco, E. Lanino); Università degli Studi di Genova (A. Moretta); Azienda Ospedaliero-Universitaria Meyer, Firenze (M. Aricò); Cambridge Institute for Medical Research, Cambridge, UK (G.M. Griffiths); A.O.U. San Martino, Genova (A. Bacigalupo)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute

Background

I linfociti NK sono importanti effettori dell'immunità innata e funzionalmente sono caratterizzati dalla produzione di citochine infiammatorie (IFN-gamma e TNF-alfa) e da una citotossicità soprattutto di tipo perforino-dipendente. Queste cellule sono regolate nella loro funzione effettrice da recettori inibitori, quali i KIR, specifici per gruppi di alleli HLA classe I (ligandi KIR), e da CD94/NKG2A che riconosce HLA-E. La funzione delle cellule NK è poi regolata positivamente da diversi recettori attivatori (NCR, NKG2D, 2B4, DNAM-1) che, stimolati da opportuni ligandi, promuovono la citolisi delle cellule che li esprimono. Grazie a una serie di anticorpi monoclonali, prodotti anche dal mio gruppo di ricerca, abbiamo potuto studiare la regolazione della suscettibilità alla lisi NK di cellule tumorali di diverso istotipo e, più recentemente, di leucemie. Dall'analisi di numerose leucemie si è dimostrata la rilevanza dell'espressione di PVR e Nectina-2 (ligandi di DNAM-1) per la suscettibilità alla lisi NK. Numerose evidenze cliniche e sperimentali hanno dimostrato che il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (allo-TCSE) deve larga parte della sua efficacia ad un'azione immunologica svolta dai linfociti NK del donatore verso la leucemia (attività GvL). Questo si spiega con il fatto che, se i linfociti NK interagiscono con cellule allogeniche, è possibile che uno o più KIR non riconoscano il loro ligando (incompatibilità KIR/HLA) e quindi risultino alloreattivi. La sottopopolazione alloreattiva di cellule NK del donatore, capace di uccidere la leucemia, può essere predetta analizzando gli aplotipi HLA classe I sia nel donatore che nel ricevente ed è possibile identificarla sulle NK tramite analisi citofluorimetrica combinando opportunamente diversi anticorpi monoclonali.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo generale del progetto consiste nell'applicare le nostre acquisizioni sulle interazioni recettore-ligando che regolano la citotossicità NK nei confronti di cellule tumorali per compiere una ricerca traslazionale di diagnostica e immunoterapia basata su cellule NK, soprattutto nell'ambito delle neoplasie ematologiche. Queste ricerche verranno applicate in due diversi contesti clinici.

- Valutazione di casi di pazienti leucemici dell'età pediatrica che ricevono allo-TCSE in particolare da donatore aploidentico (aplo-TCSE). Nei casi con incompatibilità KIR/HLA verrà identificata la sottopopolazione NK alloreattiva presente nel donatore e, qualora possibile, un confronto di più donatori verrà effettuato al fine di scegliere quello con maggiore potenzialità di attuare una GvL in seguito al trapianto. Verranno analizzati i pazienti dopo ricostituzione immunologica dal trapianto valutando il repertorio NK e in particolare se la sottopopolazione alloreattiva viene mantenuta nel tempo. Parallelamente sarà possibile analizzare la capacità litica delle cellule NK nei confronti sia dei blasti leucemici che di linee cellulari B-EBV esprimenti lo stesso aplotipo HLA del paziente. I blasti leucemici saranno anche studiati fenotipicamente per l'espressione dei ligandi noti dei recettori attivatori, che correla con la suscettibilità alla lisi NK-mediata. Queste analisi saranno correlate con il decorso clinico dei pazienti per valutare l'impatto della presenza di cellule NK alloreattive originate dalle cellule staminali del donatore nel prevenire la ricaduta leucemica. Inoltre, qualora i linfociti NK del donatore risultino favorevoli come alloreattività e attività anti-leucemica, sarà possibile utilizzare queste cellule attivate in vitro con IL-2 per approcci immunoterapici finalizzati a contrastare eventuali recidive leucemiche. Verranno anche valutati casi di aplo-TCSE senza incompatibilità KIR/HLA per capire se un particolare repertorio KIR, in particolare considerando la presenza di KIR attivatori, correla con il decorso clinico in quanto a ricaduta leucemica e presenza di infezioni. È stato descritto che i trapianti in cui la madre è il donatore hanno un decorso più favorevole rispetto agli altri aplo-TCSE con diversi donatori. Verrà valutata la presenza di cellule NK con attività anti-leucemica possibilmente per identificare marcatori rilevanti e capire se i linfociti NK oppure i T materni sono coinvolti nell'attività GvL.

- Un altro obiettivo di questo progetto è lo studio di pazienti affetti da linfocitocitosi emofagocitica familiare (FHL) in cui è costantemente riportato un difetto dell'attività citotossica. Per una parte dei casi questo difetto è stato dimostrato dipendere da deficit di perforina (mutazioni del gene PRF1), definendo il sottogruppo FHL2, oppure da anomalia esocitosi dei granuli citotossici (mutazioni del gene Munc13-4), definendo il sottogruppo FHL3. Il contributo del nostro gruppo consiste nella messa a punto di test diagnostici che possano prontamente indirizzare verso l'identificazione del tipo di anomalia e quindi del gene da studiare per le mutazioni. Inoltre studieremo linfociti NK derivati dai casi con difetti ancora non noti, nel tentativo di rivelare anomalie nelle loro funzioni alla scoperta di nuovi geni-malattia. Alcuni pazienti che hanno sviluppato linfomi e leucemie sono stati descritti avere mutazioni mono- e bi-alleliche del gene della perforina suggerendo che la perforina gioca un ruolo fondamentale nei meccanismi di immuno-sorveglianza che previene la crescita e/o lo sviluppo tumorale. La terapia dei pazienti con FHL è rappresentata da allo-TCSE per poter ripristinare una corretta risposta citotossica. In attesa del trapianto è possibile prospettare una immunoterapia basata su cellule NK di supporto a questa immunodeficienza.

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Impatto assistenziale certo o potenziale

La ricaduta di queste ricerche in campo clinico-assistenziale è sicuramente di grande impatto, in quanto rientrano in una diagnostica avanzata e la nostra collaborazione con i clinici, specialmente nell'ambito dell'onco-ematologia, è intensa e costante. Nello specifico:

- E' già in atto una collaborazione con l'Oncoematologia Pediatrica dell'IRCCS S. Matteo di Pavia, per cui forniamo una consulenza sul repertorio NK di donatori di cellule staminali emopoietiche per selezionare quello con maggiore potenzialità di attuare una GvL in seguito al trapianto.
- Tramite opportuni test immunologici, siamo coinvolti nella diagnostica della FHL orientando verso specifici test genetici, che sono svolti e coordinati dall'Oncoematologia Pediatrica del Meyer di Firenze.
- Si sta cercando di mettere a punto le procedure per una immunoterapia basata sulle cellule NK di supporto al trapianto per i pazienti leucemici e per i pazienti FHL.

Risultati e prodotti 2010

Le nostre ricerche sui modelli diagnostici e terapeutici basati sulle cellule NK si sviluppano in due diversi contesti clinici: aplo-TCSE e FHL.

- Abbiamo continuato a seguire i casi pediatrici di aplo-TCSE per la cura di leucemie per allungare il follow-up. Effettivamente le curve di sopravvivenza dei pazienti che hanno ricevuto aplo-TCSE da donatore NK alloreattivo sono significativamente migliori di quelle da donatore non-NK alloreattivo (rispettivamente 73% vs 42% per pazienti ALL e 42% vs 22% per AML). Una nostra review mette in luce queste ricerche (Moretta L. et al. Blood prepublished). Abbiamo fatto notevoli progressi nella caratterizzazione fenotipica del repertorio NK, in modo da valutare la presenza e la quantizzazione del subset alloreattivo nel donatore al fine di selezionare quello con maggiore attività anti-leucemica. E' in quest'ambito che si colloca uno studio che, comparando il repertorio KIR a livello genotipico e fenotipico di una coorte di donatori, ci ha permesso di rivelare una "specificità anomala" di alcuni mAb anti-KIR di uso comune, che può fuorviare sul significato funzionale di alcuni subset NK (Falco M. et al. JI 2010). Questa dimostrazione è stata possibile grazie all'individuazione dei residui aminoacidici critici per la reattività di questi mAb anti-KIR.

E' iniziata da pochi mesi la collaborazione con il gruppo di A. Bacigalupo dell'Ospedale San Martino di Genova, per studiare gli aplo-TCSE T-repleti in pazienti adulti con leucemie o linfomi.

- Nell'ambito di FHL, abbiamo pubblicato una review (Cetica V. et al. Haematologica 2010) che descrive l'eterogeneità genetica di questa malattia, riassumendo le basi molecolari dei diversi tipi finora identificati (da FHL1 a FHL5), specificando i vari geni-malattia, le mutazioni e i deficit funzionali associati alla mancanza o alterazione delle diverse molecole. Tutti questi deficit funzionali sono nell'ambito della citotossicità, ma i meccanismi implicati sono distinti a seconda del gene coinvolto. Combinando vari test, basati principalmente sui linfociti NK, siamo in grado di rilevare il particolare deficit funzionale del paziente e indirizzare verso specifiche analisi genetiche e quindi verso la diagnosi. Abbiamo partecipato allo studio funzionale su pazienti che si sono rivelati essere FHL5, cioè caratterizzati da mutazioni di STXBP2, l'ultimo gene-malattia scoperto nel 2009 (Cetica V. et al. J. Med. Genet. 2010).

Pubblicazioni

Cetica V.-Pende D.-Griffiths G.-Arico' M.
Molecular basis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis.
Haematologica 95(4):538/541, 2010

Cetica V.-Santoro A.-Gilmour K.-Sieni E.-Beutel K.-Pende D.- Marcenaro S.-Koch F.-Grieve S.-Wheeler R.-Zhao F.-Zur Stadt U.- Griffiths G.-Arico' M.
STXBP2 mutations in children with familial haemophagocytic lymphohistiocytosis type 5.
J. Med. Genet. 47:595/600, 2010

Falco M.-Romeo E.-Marcenaro S.-Martini S.-Vitale M.-Bottino C.- Mingari M.C.-Moretta L.-Moretta A.-Pende D.
Combined genotypic and phenotypic killer cell Ig like receptor analyses reveal KIR2DL3 alleles displaying unexpected monoclonal antibody reactivity: identification of the amino acid residues critical for staining.
J. Immunol. 185:433/441, 2010

Moretta L.-Locatelli F.-Pende D.-Marcenaro E.-Mingari M.C.-Moretta A.
Killer Ig like receptor mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation.
Blood Epub Oct 1, 2010

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Lo studio sui linfociti NK nell'ambito dei trapianti continuerà analizzando non solo il follow-up di casistiche di aplo-TCSE ma anche valutando nuove casistiche. Infatti, mentre è da vari anni che seguiamo i casi di pazienti leucemici pediatrici sottoposti a trapianto-aplo con cellule purificate CD34+, è da pochi mesi che abbiamo iniziato lo studio di pazienti adulti affetti da leucemie o linfomi sottoposti a trapiantato-aplo T-repleto. Questi ultimi casi vengono trapiantati utilizzando cellule di midollo intero e seguono un intenso protocollo farmacologico immunosoppressivo post-trapianto per evitare GvHD. La ricostituzione immunologica sembra molto rapida e i risultati clinici favorevoli. Valuteremo se anche in questa casistica l'alloreattività NK e/o la presenza di KIR attivatori possano svolgere un ruolo positivo per l'attività anti-leucemica e il decorso clinico. Inoltre, un'ulteriore evoluzione degli aplo-TCSE è rappresentata dall'utilizzo di cellule purificate deplezionando le cellule TCRalfa/beta e CD20: in questo modo si infondono non solo cellule staminali ma anche cellule mature tra cui NK e Tgamma/delta. Questo tipo di trapianto, che il gruppo di F. Locatelli di Pavia ha appena iniziato a fare, porterebbe il vantaggio di fornire da subito al paziente cellule immunocompetenti con attività anti-leucemica e di difesa contro le infezioni, evitando però linfociti responsabili di GvHD. Tutti questi casi verranno da noi caratterizzati con analisi genetiche, fenotipiche e funzionali su campioni del donatore e del paziente pre- e post-trapianto.

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

In ambito di FHL, continueranno le analisi funzionali diagnostiche di pazienti con quadro clinico compatibile con questa malattia. Casi di FHL verranno caratterizzati con studi di genotipo-fenotipo. Ci si focalizzerà sui casi che si rivelassero wild-type per tutti i geni-malattia noti ma con difetto funzionale della citotossicità per la ricerca di nuovi geni.