

s.c. Immunologia

Caratterizzazione in vitro ed in vivo della funzione di recettori inibitori in grado di indurre arresto proliferativo in cellule mieloidi normali e leucemiche

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

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

Responsabile scientifico: Maria Cristina Mingari

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Raffaella Augugliaro, Romana Conte

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: recettori inibitori; leucemie; differenziamento mieloido; ciclo cellulare; apoptosi

Altre strutture IST partecipanti: s.s. Animal facility (M. Sanguineti)

Altri Enti coinvolti: Istituto G. Gaslini, Genova; Dipartimento Medicina Sperimentale, Università di Genova (C. Vitale); Banca Cordone Ombelicale, A.O.U. San Martino, Genova

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute

Background

Siglec-7(p75/AIRM-1) e CD33 sono due recettori inibitori appartenenti alla famiglia delle sialoadesine, entrambi espressi da cellule mielomonocitarie. Hanno un buon grado di omologia e le loro code intracitoplasmatiche hanno sequenze ITIM in grado di reclutare le fosfatasi SHP-1 o -2 (Mingari et al. Immunol Rev. 2001). Il loro "crosslinking" con anticorpi monoclonali inibisce la proliferazione e differenziamento in vitro di precursori mieloidi CD34+ coltivati in presenza di GM-CSF (Granulocyte-Macrophage- Colony Stimulating Factor), fattore di crescita specifico per il differenziamento di cellule mielomonocitarie. Un effetto analogo è stato osservato su cellule isolate da leucemie mieloidi umane. Il legame di CD33 induce apoptosi della cellula bersaglio e l'uso simultaneo di etoposide ha un effetto sinergico. Il "crosslinking" di Siglec-7 si limita ad un blocco proliferativo/differenziativo.

L'uso di ligandi specifici per CD33 o Siglec-7 potrebbe quindi rappresentare una risorsa nella messa a punto di nuovi protocolli terapeutici contro le leucemie mieloidi. Questa prospettiva ha spinto vari gruppi a cercare di caratterizzare sia meccanismi che sottendono agli effetti inibitori sia meccanismi che possano eluderli: è stato dimostrato ad esempio che l'azione di Siglec-7 e CD33 è modulata dall'interazione dei loro motivi ITIM con SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signalling 3) (Crocker et al., Nat Rev Immunol, 2007). Nostri precedenti esperimenti suggerivano che il crosslinking di Siglec-7 inibisce l'espressione di ciclina D1 e dati molecolari preliminari indicherebbero la modulazione di importanti fattori di trascrizione come EGR-1, proteina coinvolta nel differenziamento mielomonocitario. Tali risultati supporterebbero l'ipotesi che queste molecole possano giocare un ruolo nel corso del differenziamento emopoietico: la loro attivazione potrebbe contribuire a decidere le sorti dei precursori mieloidi. Questi studi sono stati condotti in vitro tramite "crosslinking" con anticorpi monoclonali dei recettori espressi sulla membrana cellulare di linee leucemiche di origine mieloido (MM6 e U937): sarebbe perciò importante confermarli anche su leucemie mieloidi fresche coltivate in vitro e nei modelli in vivo di leucemia mieloido.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo generale del nostro progetto è verificare il ruolo regolatorio di queste molecole nei processi proliferativi e differenziativi nel corso della mielopoiesi e la loro potenziale attività anti-leucemica. Intendiamo operare attraverso due diversi approcci sperimentali.

Il primo valuterà la suscettibilità in vitro al "crosslinking" di CD33 e/o Siglec7 di precursori emopoietici isolati da sangue cordonale e da leucemie mieloidi CD33+Siglec-7+ isolate da pazienti emato-oncologici.

Il secondo approccio sperimentale valuterà in vivo gli effetti del "crosslinking", con anticorpi monoclonali, di Siglec-7 o CD33 espressi da un modello di leucemia mieloido (linea U937) indotta in topi NOD/SCID IL2rg-/- (in collaborazione con il laboratorio di Oncologia dell'Istituto Giannina Gaslini di Genova, Dr. Vito Pistoia).

Impatto assistenziale certo o potenziale

La verifica di un'efficace attività anti-leucemica in vivo in modelli murini potrebbe essere determinante per valutare la messa a punto di anticorpi monoclonali specifici per Siglec 7 umanizzati con potenziale ruolo terapeutico e destinati all'uso nel paziente.

Risultati e prodotti 2010

Nel corso del 2010 abbiamo selezionato tre leucemie mieloidi acute CD38+CD45+CD33+Siglec-7 +/- isolate da pazienti alla diagnosi e le abbiamo utilizzate in tre esperimenti successivi utilizzando topi di ceppo NOD/SCID IL2rg-/- . In ognuno di questi esperimenti i topi erano suddivisi in tre gruppi: 1) topi inoculati con la sola leucemia; 2) topi inoculati con la leucemia e trattati successivamente per due mesi con anticorpo monoclonale anti-Siglec-7; 3) topi inoculati con

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

la leucemia e trattati per due mesi con anticorpo monoclonale irrilevante come controllo. Tutte le leucemie utilizzate nei diversi esperimenti hanno attecchito in questo modello murino: la maggiore concentrazione di cellule CD38+CD45+/-CD33+/- Siglec7+/- era evidenziabile nei campioni isolati dal midollo osseo quantunque sia nel sangue periferico che nella milza era possibile rinvenire cellule leucemiche umane. L'analisi cumulativa dei nostri dati indica che il trattamento dei topi con l'anticorpo anti-Siglec-7 induce una specifica e statisticamente significativa riduzione del numero totale delle cellule mononucleate presenti nel midollo osseo e nel sangue periferico. Analisi preliminari indicano che i topi trattati con anti-Siglec-7 evidenziano una riduzione significativa proprio della popolazione leucemica CD45+Siglec-7+ rivelando l'effetto specifico dell'anticorpo anti-Siglec-7 rispetto a quello di controllo. Soprattutto in un caso si è evidenziata l'efficacia del trattamento con anti-Siglec-7. Infatti, in seguito al trattamento con l'anticorpo specifico anti-Siglec-7, non sono state rinvenute cellule leucemiche CD45+CD33+Siglec-7+ né nel sangue periferico, né nella milza dei topi mentre le cellule leucemiche erano rintracciabili negli stessi compartimenti nei topi di controllo. L'analisi del midollo osseo ha confermato tale tendenza evidenziando una drastica riduzione delle cellule CD45+CD33+Siglec-7+ rispetto ai controlli. In tutti gli esperimenti sono state effettuate anche analisi del ciclo cellulare e dell'apoptosi per valutare la vitalità delle cellule recuperate nei vari distretti. Non sono state rinvenute differenze significative: le cellule recuperate dai topi sottoposti ai diversi trattamenti avevano una vitalità ed un pattern di ciclo cellulare sovrapponibili.

Pubblicazioni

Vacca P.-Vitale C.-Montaldo E.-Conte R.-Cantoni C.-Fulcheri E.-Darretta V.-Moretta L.-Mingari M.C.
CD34+ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiated into NK cells upon interaction with stromal cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, in press

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Nel corso del 2011 completeremo l'analisi degli esperimenti effettuati e completati. Stiamo inoltre lavorando per armonizzare i risultati ottenuti con il modello di tumore solido derivato dall'inoculo della linea mieloide U937 e quelli ottenuti dopo l'inoculo delle leucemie acute isolate da pazienti.

Oltre a completare l'analisi statistica dei risultati ottenuti con indagini in immunofluorescenza, effettueremo valutazioni di tipo molecolare su alcuni dei campioni cellulari isolati sia dai topi di controllo sia da quelli trattati, soprattutto nell'intento di confermare l'origine umana delle cellule leucemiche recuperate e di valutare lo stato di attivazione di alcune vie di trasduzione del segnale come STAT-5 e SOCS3, che sembra coinvolto nella modulazione del segnale mediato da Siglec-7.

Sono anche in programma esperimenti che prevedono l'inoculo nei topi di nuove leucemie, ed il loro successivo trattamento con gli anticorpi, nonché valutazioni in vitro delle stesse cellule leucemiche.

Isolamento e caratterizzazione di cellule staminali tumorali da melanoma metastatico e carcinoma ovarico: identificazione di nuovi marcatori molecolari da utilizzarsi come possibili bersagli dell'attività delle cellule Natural Killer

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

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

Responsabile scientifico: Maria Cristina Mingari

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Barbara Carnemolla, Massimo Vitale, Raffaella Augugliaro

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: cellula staminale tumorale; cellule NK; recettori attivatori; angiogenesi tumorale

Altre strutture IST partecipanti: s.s. Animal facility (E. Ognio); s.c. Oncologia medica A (P. Queirolo); s.c. Oncologia medica C (M. Bruzzone); s.c. Oncologia chirurgica (F. Cafiero)

Altri Enti coinvolti: Istituto G. Gaslini, Genova (V. Pistoia); Dip. di Ginecologia, Università di Genova (N. Ragni); Dip. di Medicina Sperimentale, Università di Genova (G. Pietra)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro; MIUR

Background

I tumori non sono costituiti da raggruppamenti cellulari omogenei, bensì originano da un assortimento eterogeneo di cellule differenziate in modo anomalo e derivate da un pool "clonale" di cellule staminali. L'esistenza di cellule staminali del tumore (CST) è stata inizialmente dimostrata nelle leucemie (Bonnet D., Dick, J.E. Nat. Med.,1997,) e successivamente in vari tumori solidi (Al-Hajj M. et al, PNAS, 2003; Singh S.K. et al, Cancer Res., 2003; Singh S.K. et

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

al, Nature, 2004; Ricci-Vitiani L. et al, Nature, 2007; O'Brien C.A. et al, Nature, 2007; Li C. et al, Cancer Res., 2007; Schatton T. et al, Nature, 2008). Le attuali terapie anti-neoplastiche convenzionali sono rivolte contro la frazione di cellule tumorali più "differenziata" e "highly cycling" e non contro le cellule staminali tumorali responsabili della rigenerazione locale del tumore (recidiva tumorale) e/o della comparsa di metastasi. Le CST infatti, sono naturalmente resistenti alla chemioterapia in quanto quiescenti (slow cycling), sono in grado di riparare efficientemente il DNA danneggiato ed esprimono proteine anti-apoptotiche o geni MDR (multidrug resistance genes) (Dean M. et al, Nat. Rev. Cancer, 2005; Gottesman M.M. et al, Nat. Rev. Cancer, 2002; Bao S. et al, Nature, 2006). Isolare e caratterizzare le cellule staminali del cancro presenti nei tumori solidi può essere molto utile per l'identificazione e lo sviluppo di nuove e più efficaci terapie sia farmacologiche che biologiche. In particolare con l'allestimento di protocolli d'immunoterapia mirati contro le CST si può pensare di generare risposte anti-tumorali più durature e selettive soprattutto nei confronti dei tumori metastatici. I principali effettori della risposta immunitaria antitumorale sono le cellule Natural Killer (NK) e i linfociti T citotossici (CTL). Antigeni tumore associati riconosciuti da linfociti T CD8+ sono stati identificati e usati in forma di vaccini in diversi trials clinici (Parmiani G. et al, J. Natl. Cancer. Instit., 2002). Per quanto riguarda le cellule NK, effettrici della risposta innata, in questi ultimi anni nel nostro laboratorio ne è stata caratterizzata l'attività effettrice grazie all'identificazione di numerosi recettori di tipo inibitorio e attivatorio. Il fine bilanciamento tra recettori inibitori e attivatori è responsabile dell'attività di questa popolazione (Moretta A. et al, Annual. Rev. Immunol., 1996; Moretta A. et al, Annual. Rev. Immunol., 2001; Moretta L. et al, Embo J., 2004). Alcuni recettori attivatori (NKp46, NKp30, NKp44, NKG2D e DNAM1) sono coinvolti nella lisi delle cellule tumorali grazie a interazioni con i rispettivi ligandi espressi dal tumore (Pende D. et al, Cancer Res., 2002; Pende D. et al, Blood, 2005). Recentemente abbiamo dimostrato che le cellule NK attivate sono in grado di lisare con estrema efficienza linee di melanoma maligno arricchite in CST, isolate sulla base dell'espressione di marcatori come il CD133 e della capacità di crescere formando sfere in appositi terreni di coltura (Pietra G. et al, Int. Immunol., 2009). È stato possibile isolare cellule con caratteristiche di CST oltre che dal melanoma anche dal carcinoma ovarico (Zhang S. et al, Cancer Res., 2008; Alvero AB. et al, Cell Cycle, 2009). Entrambi i tumori condividono un'elevata aggressività e limitate opzioni di trattamento specialmente quando la malattia passa alla fase metastatica. Inoltre per il carcinoma ovarico ancor oggi non disponiamo di strumenti di screening che ne consentano l'identificazione precoce diagnosticando la malattia ad uno stadio in cui essa è curabile.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Questo progetto, ampliamento e continuazione di un progetto precedente si propone nel suo insieme di identificare nuovi bersagli tumorali da utilizzarsi per approcci terapeutici innovativi.

In particolare saranno perseguiti i seguenti obiettivi:

- 1) Isolare e caratterizzare CST da melanoma e carcinoma ovarico e identificare nuovi marcatori da utilizzare come bersagli terapeutici
- 2) Valutare la suscettibilità alla lisi da parte delle cellule NK di putative CST isolate dai due tipi di tumore
- 3) Valutare la capacità delle cellule NK di prevenire o inibire la crescita del tumore in vivo (ottenuto trapiantando cellule con caratteristiche di CST nel modello murino NOD/SCID il2rg -/-)
- 4) In particolare nel caso del melanoma, indagare se ipotetiche CST isolate dal tumore possano contribuire alla sua formazione promuovendo un'angiogenesi di tipo classico o attraverso fenomeni di "mimetismo vascolare".

Impatto assistenziale certo o potenziale

L'applicazione delle nuove conoscenze potrà essere utile per l'identificazione di nuovi target molecolari del tumore a scopo diagnostico e per lo sviluppo di nuove terapie anti-tumorali mirate.

Risultati e prodotti 2010

Durante il primo anno di attività abbiamo dimostrato che le cellule tumorali di melanoma esercitano una profonda inibizione sull'attivazione delle cellule NK "resting" che si ravvisa sia in un fenotipo alterato che in una compromessa funzione effettrice. Nel corso del 2010 al fine di chiarire i meccanismi attraverso cui le cellule di melanoma esercitano tale effetto regolatorio, abbiamo preso in considerazione il ruolo di fattori solubili, già noti per essere prodotti dalle cellule tumorali ed implicati nell'inibizione di altre cellule del sistema immunitario. È noto, infatti, che i tumori sfuggono al riconoscimento da parte delle cellule del sistema immunitario producendo fattori solubili immunosoppressori. In particolare, abbiamo analizzato il possibile ruolo immunomodulante svolto dalla prostaglandina E2 (PGE2), dall'enzima indoleammina-2,3-diossigenasi (IDO), dal TGF-beta e dal fattore inibente la migrazione dei macrofagi (MIF). Utilizzando inibitori specifici di tali fattori in co-culture tra cellule NK e cellule di melanoma abbiamo valutato se la presenza dell'inibitore potesse esitare in un ripristino della funzione NK analizzata. A tal fine abbiamo utilizzato l'1-Metil-Triptofano (un inibitore dell'enzima IDO), il reagente NS-398 (un inibitore della sintesi della PGE2) e anticorpi neutralizzanti la funzione del TGF-beta e di MIF. I dati ottenuti dimostrano che l'enzima IDO e il fattore solubile PGE-2, sono coinvolti nell'inibizione dell'attività citotossica delle cellule NK. I risultati ottenuti potranno fornire informazioni utili per ottimizzare protocolli di immunoterapia adottiva che prevedono l'utilizzo delle cellule NK. Il passo logico successivo di questo studio sarà quello di verificare se l'inibizione osservata possa interessare anche altre funzioni delle cellule NK, quali la proliferazione e la produzione di citochine/chemochine.

Pubblicazioni

Pietra G.-Romagnani C.-Manzini C.-Moretta L.-Mingari M.C.

The emerging role of HLA/E restricted CD8+ T lymphocytes in the adaptive immune response to pathogens and tumors.

J. Biomed. Biotechnol. 2010; 907092; 1/907092; 8, 2010

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Presentazioni a congressi

Pietra G.-Manzini C.-Rivara S.-Vitale M.-Balsamo M.-Cantoni C.-Conte R.-Moretta L.-Mingari M.C.
Melanoma cells interfere with the activity of NK cells by modulating their phenotype and cytotoxic function.
VIII NIBIT Meeting. Certosa di Pontignano, Siena, 7-9, Ottobre 2010

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Gli obiettivi della nostra ricerca nel 2011 si articoleranno nei seguenti punti:

1) Evidenze sperimentali ottenute anche dal nostro gruppo di ricerca suggeriscono che le cellule di melanoma possono essere riconosciute in vitro da cellule NK attivate (G. Pietra et al., Int. Immunol. 2009). Dal momento che vi sono scarsi dati sperimentali sulla capacità delle cellule NK di inibire la crescita delle cellule di melanoma in vivo, nel corso del 2011 studieremo la capacità delle cellule NK di prevenire o inibire la crescita in vivo delle cellule di melanoma. A tal fine, le cellule di melanoma saranno inoculate in topi immunodeficienti NOD/SCID IL2rg -/- (2 x 10⁶ cellule/topo). Dieci giorni dopo l'inoculo delle cellule tumorali verranno somministrate (ev) agli animali cellule NK umane attivate da diversi stimoli citochinici (IL-2, IL-15, IL-12, IL-18), (1.5 x 10⁶ cellule NK/topo). Nei successivi 70 giorni verrà monitorata: 1) la sopravvivenza dei topi trattati con le cellule NK rispetto ai topi di controllo; 2) il fenotipo delle cellule NK che sono state "reclutate" nel sito di sviluppo del tumore; 2) la grandezza della massa tumorale (diametro) cresciuta nei topi trattati rispetto ai topi controllo.

2) Analizzeremo fenotipicamente e funzionalmente le cellule NK presenti nei liquidi ascitici ottenuti da pazienti affetti da carcinoma ovarico. Ci focalizzeremo soprattutto sull'analisi dell'espressione dei co-recettori e dei recettori attivatori (quali DNAM-1 and 2B4) sulle cellule NK isolate dai liquidi ascitici (tumor-associated NK cells, TANK). Inoltre, valuteremo l'espressione su tali cellule dei recettori per le chemochine. La nostra analisi fenotipica verrà svolta anche sui macrofagi presenti nei liquidi ascitici. Focalizzeremo la nostra attenzione sui macrofagi anche perché è nostra intenzione valutare se essi possano modulare la funzione delle cellule TANK. Infatti, è stato descritto che nei liquidi ascitici di pazienti da carcinoma ovarico, una sottopopolazione di macrofagi che esprime in superficie il recettore inibitorio B7H4 è in grado di inibire le risposte specifiche T-mediate. Quindi, è nostra intenzione studiare la modulazione funzionale delle cellule NK in risposta al continuo contatto sia con le cellule tumorali che con i macrofagi presenti nei liquidi ascitici.

Studio degli effetti del microambiente tumorale sull'attività delle cellule NK: identificazione e caratterizzazione di nuove vie di immuno-modulazione attivate dal tumore

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

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

Responsabile scientifico: Massimo Vitale

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Raffaella Augugliaro

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: cellule NK; microambiente tumorale; fibroblasti; ipossia

Altre strutture IST partecipanti: s.c. Oncologia medica A (P. Queirolo); s.c. Oncologia chirurgica (F. Cafiero)

Altri Enti coinvolti: Istituto G. Gaslini, Genova (L. Varesio, L. Moretta, C. Cantoni); DIMES, Università di Genova (B. Sparatore, A. Moretta); Università di Padova (G. Semenzato, R. Zambello); Servizio di Anatomia Patologica, Spedali Civili di Brescia (W. Vermi, F. Facchetti)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro; Ministero della Salute

Background

Nonostante il progredire delle conoscenze sull'immunologia dei tumori, l'efficacia degli approcci immunoterapeutici per il trattamento dei tumori solidi rimane limitata. Ciò può essere determinato dal fatto che le cellule effettrici che raggiungono il tumore possono essere fortemente influenzate dal microambiente generato in situ. Nel tumore, infatti, fattori cellulari (fibroblasti, cellule endoteliali, DC, fagociti e le cellule neoplastiche stesse) ed extra-cellulari (proteine della matrice, enzimi, citochine e altri mediatori di segnale), interagendo reciprocamente, contribuiscono a formare un complesso microambiente in grado di influenzare sia la progressione del tumore stesso che la qualità della risposta immunitaria montata dall'ospite. L'induzione di linfociti T regolatori (Treg) o di cellule mieloidi soppressorie, così come la produzione di diversi fattori con attività immuno-modulatrice (quali arginase-1, NOS-2, IDO, TGF-beta) rappresentano spesso tratti funzionali distintivi del microambiente generato nell'ambito del tumore. In molti casi, i fibroblasti associati al tumore (Tumor Associated Fibroblasts - TAF) giocano un ruolo determinante nella

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

formazione e nel mantenimento di tale microambiente. Queste cellule, infatti, in risposta a diversi fattori rilasciati dal tumore, quali FGF, PDGF o TGF-beta, vanno incontro a cambiamenti fenotipici e funzionali che consentono loro di contribuire alla progressione tumorale, mediante secrezione di fattori di crescita e/o trasformanti (TGF-beta, IGF, HGF), fattori angiogenici (VEGF) ed enzimi proteolitici (MMPs) che, catalizzando la degradazione della matrice extracellulare, facilitando l'invasione e la metastatizzazione. Esistono tuttavia ancora pochi dati in letteratura riguardo alle capacità dei TAF di influenzare in maniera determinante la risposta immunitaria contro tumore.

Un altro elemento di cui tener conto per valutare l'efficacia di una risposta immunitaria nel sito tumorale è rappresentato dal fatto che, a causa dell'inappropriata vascolarizzazione dello stroma tumorale, il tumore può presentare zone in cui persiste una bassa tensione di ossigeno. Diversi studi hanno suggerito come le "nicchie ipossiche" possano contenere, fra le altre, quelle cellule (chiamate Cancer Stem Cells - CSC) con caratteristiche funzionali determinanti per la rigenerazione ed il mantenimento del tumore stesso. Anche in questo caso è poco noto se e come un ambiente ipossico possa influenzare la risposta immunitaria.

Tra gli effettori coinvolti nella risposta dell'ospite contro i tumori, le cellule Natural Killer (NK) giocano un ruolo importante, sia perché capaci di uccidere direttamente cellule trasformate, sia perché, grazie alla loro capacità di produrre citochine pro-infiammatorie (IFN-gamma e TNF-alpha) e di interagire in cross-talk funzionali con le cellule dendritiche (DC), sono coinvolte nella regolazione e polarizzazione della risposta immunitaria specifica. L'attività citolitica, la produzione di citochine, nonché la capacità di sostenere cross-talk funzionali con le DC, sono regolate da un'ampia gamma di recettori di superficie quali i KIR (Killer Ig-like Receptors - recettori specifici per molecole HLA di classe I) ed i recettori attivatori NKp46, NKp30, NKp44, NKG2D e DNAM-1 (attraverso i quali le cellule NK possono riconoscere ed uccidere cellule tumorali). In seguito ad attivazione (per esempio attraverso l'esposizione a citochine come IL-2, IL-15, IL-12, IL-23), le cellule NK possono migliorare notevolmente la propria capacità di riconoscere bersagli tumorali e la propria efficienza citolitica, sia perché up-regolano l'espressione dei propri granuli citolitici (granzymes e perforine) e di svariati recettori attivatori fra cui NKp30, NKG2D e NKp46, e sia perché esprimono ex novo altri recettori quali NKp44 e CD69, capaci di attivare ulteriormente la loro risposta funzionale.

Le cellule NK rappresentano dunque una potenziale risorsa per l'allestimento di nuove strategie terapeutiche. Per poter sfruttare al meglio tale potenzialità, tuttavia, è necessario indagare a fondo i possibili meccanismi messi in atto dal tumore per sovvertire l'efficacia dell'attività NK e verificare quali sono le condizioni di attivazione più efficaci per superare questi effetti immunosoppressivi. Studi recenti, eseguiti anche nel nostro laboratorio, hanno indicato che diversi fattori che possono essere presenti nel microambiente tumorale quali IDO, TGF-beta o ligandi solubili del recettore NKG2D possono effettivamente influenzare l'efficacia funzionale delle cellule NK o la loro capacità di attivarsi in risposta ad IL-2. Un altro elemento che potrebbe giocare un ruolo nelle interazioni fra cellule NK e microambiente tumorale è rappresentato da HMGB-1 (High Mobility Group Box-1), una fattore nucleare, espresso sia da cellule NK che da cellule tumorali, che può essere rilasciato nell'ambiente extracellulare e svolgere funzioni pro-infiammatorie. I meccanismi che regolano il rilascio attivo di HMGB-1 da parte delle cellule NK sono solo in parte caratterizzati, mentre non è noto il possibile effetto di questa citochina sulla funzione NK.

La nostra intenzione è dunque quella di proseguire gli studi per caratterizzare i circuiti regolatori che si possono stabilire fra cellule NK e microambiente tumorale ed individuare nuovi elementi (cellulari o molecolari) del microambiente tumorale capaci di interferire con l'attività delle cellule NK. Inoltre abbiamo intenzione di analizzare le pathways di attivazione delle cellule NK e caratterizzare le basi molecolari dell'aumentata efficienza della risposta mediata dai recettori attivatori NK in diverse condizioni di attivazione (per esempio in seguito a stimolazione con differenti citochine).

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Saranno identificate e/o approfondite le diverse interazioni molecolari coinvolte nella regolazione dell'attività delle cellule NK da parte del microambiente tumorale. In particolare, i nostri studi si focalizzeranno sull'analisi di materiale biologico derivato da campioni di melanoma metastatico. I nostri obiettivi specifici saranno:

- Analisi del ruolo dei fibroblasti derivati dallo stroma tumorale nel condizionare l'attività delle cellule NK e caratterizzazione degli eventuali meccanismi di azione.
- Analisi delle interazioni fra cellule neoplastiche e cellule NK (resting o attivate con diverse citochine o altri fattori) ed identificazione di possibili meccanismi di modulazione reciproca del fenotipo di superficie e della funzione.
- Caratterizzazione del ruolo di HMGB1 nelle interazioni NK/tumore.
- Analisi dell'effetto dell'ambiente ipossico sulla funzionalità delle cellule NK.
- Studio dei meccanismi che permettono di massimizzare l'efficienza funzionale della cellula NK: caratterizzazione delle possibili sinergie nella trasduzione di segnali positivi mediati da recettori indotti in seguito ad attivazione cellulare.

Impatto assistenziale certo o potenziale

I risultati ottenuti forniranno elementi utili per identificare nuove molecole e/o fattori da utilizzare come vettori o come bersaglio in terapie innovative.

La generazione di nuovi reagenti (mAbs) specifici per markers tumorali o per molecole coinvolte nelle interazioni NK/tumore potranno fornire la base per la generazione di strumenti diagnostici o terapeutici.

Risultati e prodotti 2010

- Nel corso dell'anno 2010 sono proseguiti gli studi atti a definire i possibili circuiti regolatori indotti durante l'interazione delle cellule NK con diversi componenti dello stroma tumorale. Dopo aver caratterizzato il ruolo di soppressione svolto dai fibroblasti derivati da lesioni metastatiche di melanoma, siamo passati ad analizzare le interazioni funzionali occorrenti fra cellule NK e cellule di melanoma. L'analisi istologica di 28 tumori primari (collaborazione con Prof. Fabio Facchetti e Dr. William Vermi - Spedali Civili di Brescia) ha rilevato che l'infiltrato NK (CD56+CD3-) nei melanomi è spesso moderato (e in alcuni casi assente). Abbiamo quindi derivato alcune linee cellulari di melanoma ed approntato esperimenti di co-cultura utilizzando bassi rapporti fra cellule Effettrici e cellule Target (E/T ratio), consistenti con il livello di infiltrato NK riscontrabile ex-vivo. In questi esperimenti, abbiamo potuto osservare che, dopo una parziale eliminazione della popolazione tumorale (rilevabile nelle prime 24 ore di co-cultura), le cellule di melanoma potevano coabitare in equilibrio con le cellule NK per alcuni giorni, ed infine prevalere. Questa

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

prima osservazione suggeriva che, in seguito ad interazione prolungata con le cellule NK, le cellule di melanoma erano in grado di innescare meccanismi di evasione dall'attività anti-tumorale delle cellule NK. Gli esperimenti funzionali hanno mostrato che, effettivamente, dopo essere state co-coltivate per 2 giorni con le cellule NK, le cellule di melanoma acquisivano una forte resistenza all'attività di "killing" mediato dalle cellule NK. D'altra parte, le cellule di melanoma erano in grado di interferire con l'incremento di espressione, indotto da IL-2, di alcuni recettori sulle cellule NK (Nkp30, Nkp44 e NKG2D) determinanti per la loro capacità di riconoscere cellule tumorali. Ulteriori studi sono attualmente in corso per meglio caratterizzare tali fenomeni.

- Nell'ambito della ricerca di nuovi marcatori che permettessero la caratterizzazione delle cellule NK nei tessuti e nelle lesioni tumorali, (collaborazione con Prof. Silvia Parolini - Università di Brescia) abbiamo generato 2 mAbs che riconoscono GPR56: un recettore di superficie specifico per l'enzima Transglutaminasi-2 presente nella matrice extracellulare. I nostri esperimenti hanno dimostrato che, nell'ambito dei Leucociti circolanti, GPR56 è selettivamente espresso dalle cellule NK (e da un piccolo subset di linfociti T). In particolare, in coerenza con la sua specificità recettoriale, GPR56 è espresso ad alta intensità sulla superficie di quelle cellule NK che, secondo studi recenti, possono migrare nei tessuti periferici (cellule CD56dimCD16+), mentre è molto meno espresso sulle cellule CD56brightCD16+/- , deputate invece a colonizzare i linfonodi. Mediante analisi istologiche abbiamo confermato che GPR56 è espresso da cellule NK localizzate in tessuti periferici infiammati (mentre non è presente su cellule NK derivate da Linfonodi). A nostra conoscenza non esistono ad oggi altri mAbs specifici per GPR56. I nostri reagenti potrebbero quindi rappresentare un nuovo strumento utile per valutare e caratterizzare la migrazione delle cellule NK nei tessuti ed in particolare nei siti tumorali.

Pubblicazioni

Della Chiesa M.-Falco M.-Parolini S.-Bellora F.-Petretto A.-Romeo E.-Balsamo M.-Gambarotti M.-Scordamaglia F.-Tabellini G.-Facchetti F.-Vermi W.-Bottino C.-Moretta A.-Vitale M.

GPR56 as a novel marker identifying the CD56dull CD16(+) NK cell subset both in blood stream and in inflamed peripheral tissues.

Int. Immunol. 22:91/100, 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

Gattazzo C.-Teramo A.-Miorin M.-Scquizzato E.-Cabrelle A.-Balsamo M.-Agostini C.-Vendrame E.-Facco M.-Albergoni M.-Trentin L.-Vitale M.-Semenzato G.-Zambello R.

Lack of expression of inhibitory KIR3DL1 receptor in patients with naturak killer cell type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes.

Haematologica 95(10):1722/1729, 2010

Vacca P.-Cantoni C.-Vitale M.-Prato C.-Canegallo F.-Fenoglio D.-Ragni N.-Moretta L.-Mingari M.C.

Crosstalk between decidual NK and CD14+ myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107(26):11918/11923, 2010

Presentazioni a congressi

Balsamo M.-Scordamaglia F.-Pietra G.-Manzini C.-Cantoni C.-Boitano M.-Queirolo P.-Vermi W.-Facchetti F.-Moretta A.-Moretta L.-Mingari M.C.-Vitale M.

Effect of melanoma-derived fibroblasts on NK cell phenotype and function.

FOCIS, Boston June 24-27, 2010

Balsamo M.-Scordamaglia F.-Pietra G.-Manzini C.-Cantoni C.-Boitano M.-Queirolo P.-Vermi W.-Facchetti F.-Moretta A.-Moretta L.-Mingari M.C.-Vitale M.

Tumor-derived fibroblasts interfere with the IL-2-induced up-regulation of activating receptors on human NK cells and suppress their functional competence.

12th. Meeting of the Society for Natural Immunity, Cavtat, Dubrovnik 11-15 September 2010

Falco M.-Romeo E.-Marcenaro S.-Martini S.-Vitale M.-Bottino C.-Mingari M.C.-Moretta L.-Moretta A.-Pende D.

Comparison between KIR genotype and phenotype allows the identification of aminoacid residues relevant for specific anti-KIR mAb reactivity.

12th. Meeting of the Society for Natural Immunity, Cavtat, Dubrovnik 11-15 September 2010

Attività previste e risultati attesi nel 2011

- Nel corso dell'anno 2011 proseguiranno gli studi riguardanti gli effetti di immunoevasione indotti dall'interazione delle cellule di melanoma con le cellule NK. In particolare saranno indagati i meccanismi molecolari attraverso i quali le cellule di melanoma acquisiscono resistenza verso l'attività di killing mediata dalle cellule NK. Sarà inoltre saggiata l'efficacia di diverse citochine nell'ampliare l'attività delle cellule NK ed indurle a superare tale fenomeno di resistenza.

- Nell'ambito degli studi riguardanti i meccanismi che permettono di massimizzare l'efficienza funzionale della cellula NK, diversi recettori indotti dall'attivazione cellulare (per es. attraverso l'esposizione a citochine quali IL-2 o IL-15) o espressi costitutivamente saranno analizzati per la loro capacità di indurre reciproche sinergie nella trasduzione di segnali positivi. L'approccio sperimentale prevede la stimolazione di selezionati recettori attivatori con mAbs specifici e l'analisi biochimica delle vie di fosforilazione indotte.

- In collaborazione con il Prof. Luigi Varesio (Laboratorio di Biologia Molecolare Istituto G. Gaslini, Genova), proseguiranno gli studi in corso riguardanti i possibili effetti dell'ipossia sulla funzione e sul fenotipo delle cellule NK.

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Ricerca di nuovi antigeni tumore associati e valutazione del loro potenziale diagnostico e terapeutico

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

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

Responsabile scientifico: Barbara Carnemolla

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Romana Conte, Paola Orecchia

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: tumor associated antigens; tumor targeting; extra cellular matrix; human recombinant antibodies; immunotherapy; diagnosis

Altre strutture IST partecipanti: s.c. Biologia cellulare (E. Balza, L. Borsi)

Altri Enti coinvolti: CNR, Milano (P.L. Mauri); Helios Klinikum Erfurt, Univ. Chefarzt des Instituts für Pathologie, Erfurt, Germany (H. Kosmehl); CBA, Genova (L. Zardi)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute; Istituto Superiore Sanità; Istituto Europeo di Oncologia

Background

Le cellule tumorali sono in grado di modificare il microambiente che le circonda attraverso il rilascio di diversi fattori di crescita e il coinvolgimento di proteasi che insieme determinano un rimodellamento dello stroma tumorale promuovendo la progressione neoplastica. Questi fattori, mediante un'azione paracrina combinata, portano ad una progressiva distruzione della normale omeostasi di un tessuto sano e inducono un processo di infiammazione cronica accompagnata da una marcata neoangiogenesi. Nel processo di modificazione del microambiente tumorale sono coinvolte anche cellule tipiche stromali come i fibroblasti che vanno incontro a uno "shift" fenotipico acquisendo caratteristiche di cellula differenziata, come accade in seguito a danno tissutale o evento di stress. E' sempre più evidente che lo stroma tumorale, ed in particolare i componenti della sua matrice extracellulare (ECM), hanno un ruolo determinante per la crescita e la progressione di un tumore solido. L' ECM si arricchisce di proteine e di particolari isoforme proteiche non espresse nel tessuto sano, che contribuiscono alla progressione tumorale. Uno dei componenti della ECM dello stroma tumorale più studiati è l' isoforma della fibronectina contenente l'extradominio ED-B (B-FN, marker di angiogenesi). In passato abbiamo dimostrato che reagenti (anticorpi ricombinanti umani) con alta affinità per questo antigene si localizzano selettivamente a livello della matrice extracellulare dei tumori, in vivo. Questo è stato dimostrato sia con studi preclinici che clinici (Neri et al, Nature Biotechnology, 1997; Tarli et al, Blood, 1999; Borsi et al, Int. J. Cancer., 2002; Santimaria et al, Clin.Cancer Res., 2003). I ligandi di questi antigeni possono selettivamente veicolare sostanze terapeutiche nei tumori, es. citochine (Carnemolla et al, Blood, 2002; Borsi et al, Blood, 2003; Halin et al, Cancer Res., 2003). Le sostanze terapeutiche veicolate selettivamente dai ligandi vengono concentrate a livello della matrice extracellulare del tumore dove esplicano la propria attività con il risultato di aumentare drammaticamente l'efficacia terapeutica dei farmaci (Carnemolla et al, Blood, 2002; Borsi et al, Blood, 2003; Halin et al, Cancer Res., 2003). Sono attualmente in corso trials clinici di fasi I/II che utilizzano uno di questi immunoterapici (L19 IL2, Carnemolla et al, Blood, 2002).

La nostra ricerca nel triennio 2009-2011 si focalizzerà sul melanoma e sul carcinoma ovarico con l'obiettivo di identificare nuovi antigeni associati sia alle membrane di cellule tumorali che alla ECM tumorale con lo scopo di aumentare i "targets" dove veicolare selettivamente differenti sostanze terapeutiche. Un nuovo potenziale marker tumorale che si vuole studiare in questo progetto è la Periostina, una proteina secretoria che si accumula nella ECM dello stroma tumorale, è coinvolta nei processi di adesione cellulare e angiogenesi e contribuisce alla progressione tumorale promuovendo la sopravvivenza e la migrazione delle cellule tumorali. La periostina è overespressa in molti tumori umani tra i quali il carcinoma mammario, polmonare, del colon e nel melanoma. Per quanto riguarda l'ovaio il trascritto della periostina è assente nel tessuto normale, ma altamente espresso nel tessuto fetale e nel carcinoma ovarico. Le cellule del carcinoma ovarico secernono la periostina che si accumula nel liquido ascitico di pazienti con questa neoplasia.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L' obiettivo della nostra ricerca è quello di:

- identificare nuovi markers associati alla membrana plasmatica di cellule tumorali o associati alla matrice extracellulare dello stroma tumorale (come ad esempio isoforme di Periostina), in particolare nel melanoma e carcinoma ovarico;
- produrre anticorpi specifici per tali proteine con lo scopo di veicolare selettivamente differenti sostanze terapeutiche nel microambiente tumorale.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Fino ad oggi non disponiamo di strumenti di screening che consentano l'identificazione precoce delle neoplasie ovariche in modo da diminuire la morbilità e mortalità, diagnosticando la malattia ad uno stadio in cui essa è curabile (Nossov

Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

et al., 2008). I tumori ovarici in stadio iniziale determinano sintomi aspecifici che non consentono al medico di base e agli specialisti operanti sul territorio di sospettare precocemente la presenza di un tumore ovarico. Disporre quindi di ligandi per nuovi markers tumorali specifici non solo per il carcinoma ovarico, ma anche per il melanoma, può potenzialmente contribuire a migliorare la diagnosi e la cura di queste neoplasie.

Risultati e prodotti 2010

Al fine di veicolare selettivamente sostanze terapeutiche nel microambiente tumorale, abbiamo prodotto e caratterizzato anticorpi monoclonali murini e ricombinanti umani specifici per potenziali nuovi markers tumorali sia della Matrice Extracellulare (ECM) dello stroma tumorale, come per esempio la periostina, sia per recettori di membrana espressi dalle cellule di melanoma umano. La periostina, una proteina secretoria che si accumula nella ECM dello stroma tumorale, è coinvolta nei processi di adesione cellulare e angiogenesi, contribuisce alla progressione tumorale promuovendo la sopravvivenza e la migrazione delle cellule tumorali ed è overespressa in molti tumori umani tra i quali il carcinoma mammario, polmonare, del colon e nel melanoma. Per quanto riguarda l'ovaio il trascritto della periostina è assente nel tessuto normale, ma altamente espresso nel tessuto fetale e nel carcinoma ovarico. Le cellule del carcinoma ovarico secernono la periostina che si accumula nel liquido ascitico di pazienti con questa neoplasia.

In questo secondo anno di sperimentazione:

- abbiamo ulteriormente caratterizzato uno degli anticorpi monoclonali da noi prodotti (mAb OC-20). Questo anticorpo è un "function-blocking monoclonal antibody" infatti l'epitopo della periostina riconosciuto dall'anticorpo è un "cell binding site" per le integrine $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$. Lo stesso anticorpo è inoltre in grado di inibire l'adesione di cellule di melanoma alla periostina. Esperimenti preliminari in vivo, condotti in topi NOD-SCID ai quali venivano impiantate sottocute cellule di melanoma umano con il mAb OC-20, hanno dimostrato che la presenza dell'anticorpo riduce del 40% la crescita del tumore rispetto ai gruppi di controllo
- è stato identificato e purificato l'antigene specifico per l'anticorpo ricombinante umano, OC46-F2, ottenuto nel primo anno di sperimentazione selezionando una "Antibody phage Display Library" su una linea di melanoma metastatico isolata da paziente. E' stato messo a punto un nuovo saggio ELISA per evidenziare questo possibile marker nel sangue di pazienti con melanoma e carcinoma ovarico. Da questi studi preliminari abbiamo visto che questo antigene è particolarmente abbondante nel liquido ascitico di pazienti con carcinoma ovarico
- abbiamo studiato l'espressione di alcuni marcatori di staminalità, quali CD133, ABCG2, Nestin ed altri, in sferoidi isolati dal liquido ascitico di pazienti affette da carcinoma ovarico. Abbiamo utilizzato queste cellule per selezionare una "Antibody phage Display Library" e abbiamo ottenuto anticorpi ricombinanti umani specifici per proteine di membrana degli sferoidi.

Pubblicazioni

Balza E.-Carnemolla B.-Mortara L.-Castellani P.-Soncini D.-Accolla R.-Borsi L.
Therapy induced antitumor vaccination in neuroblastomas by the combined targeting of IL/2 and TNFalpha.
Int. J. Cancer 127:101/110, 2010

Ventura E.-Sassi F.-Parodi A.-Balza E.-Borsi L.-Castellani P.-Carnemolla B.-Zardi L.
Alternative splicing of the angiogenesis associated extra domain B of fibronectin regulates the accessibility of the B/C loop of the type III repeat 8.
PLoS One 5(2):e9145; 1/e9145;5, 2010

Presentazioni a congressi

Orecchia P.-Conte R.-Castellani P.-Balza E.-Mingari M.C.-Carnemolla B.
A monoclonal antibody specific for a cell binding site of periostin, a matricellular protein: evidences for its preferential localization inside melanoma cells.
SIC Roma, Ottobre 2010

Ventura E.-Balza E.-Sassi F.-Parodi A.-Castellani P.-Carnemolla B.-Zardi L.-Borsi L.
Alternative splicing of the angiogenesis associated extra-domain b of fibronectin regulates the accessibility of the b-c loop of the type iii repeat 8.
SIC Roma, Ottobre 2010

Attività previste e risultati attesi nel 2011

Nel prossimo anno di sperimentazione intendiamo:

- ampliare gli studi preclinici con il mAb OC-20 allo scopo di testare le potenzialità terapeutiche di questo anticorpo non solo in modelli sperimentali murini di melanoma, ma anche di carcinoma ovarico
- estendere il test ELISA per evidenziare l'antigene riconosciuto dall'anticorpo ricombinante umano, OC46-F2, nel liquido ascitico e nel sangue di pazienti con carcinoma ovarico. Da questi test ci aspettiamo di valutare le potenzialità di questo antigene come marker per il carcinoma ovarico
- identificare e caratterizzare gli antigeni specifici degli anticorpi ricombinanti per proteine di membrana degli sferoidi isolati dal liquido ascitico di pazienti con carcinoma ovarico. Avendo dimostrato che le cellule isolate dal liquido ascitico di pazienti con carcinoma ovarico presentano un fenotipo simile a quello delle "Cancer Stem Cells", ci aspettiamo che dalla caratterizzazione degli anticorpi ricombinanti da noi selezionati su questo tipo di cellule, possa essere prodotto e quindi essere disponibile per studi preclinici, un nuovo potenziale farmaco biologico per questa neoplasia.