

**s.c. Medicina rigenerativa**

**Un modello tissutale tridimensionale per lo studio dell'interazione di cellule tumorali con il microambiente dell'osso**

*Linea di ricerca:* 2 - Interazioni Tumore-Ospite

*Programma:* a - Ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica

*Responsabile scientifico:* Ranieri Cancedda

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Sara Tavella, Paolo Pirani

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* osso; metastasi; cellula staminale; coltura cellulare; microambiente

*Altri Enti coinvolti:* Istituto di Bioimmagini e Fisiologia Molecolare, IBFM, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Genova/Milano (F. Descalzi); Dipartimento di Oncologia, Biologia e Genetica, Università di Genova (M. Mastrogiacomo, R. Tasso, D. Costa, A. Ruggiu)

*Tipologia progetto:* tecnologie abilitanti

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

*Soggetti cofinanziatori:* Commissione Europea

*Background*

Lo scheletro è un sito di elezione per le metastasi di tumori del seno, della prostata, del polmone e di mielomi multipli. Le metastasi ossee spesso progrediscono con elevata patologia correlata con perdita ossea nei tumori osteolitici o aumento di deposizione ossea nei tumori blastici, e accompagnata da dolore osseo, ipercalcemia, fratture, e compressione della colonna vertebrale. Le metastasi ossee sono particolarmente pericolose perché la diagnosi negli stadi iniziali è resa difficile dalla natura dell'osso ed in stadi tardivi la possibilità di cura è molto diminuita. La scarsa accessibilità del tessuto osseo impedisce anche una piena comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari che regolano la colonizzazione da parte di cellule cancerogene. Per studiare in vitro questi fenomeni ed in particolare le interazioni fra cellule tumorali, cellule dell'osso e la stessa matrice ossea, le classiche colture cellulari in "monolayer" non rappresentano un sistema ideale perché non presentano la complessità dell'architettura del tessuto osseo e sono quindi molto più accessibili da parte delle cellule tumorali. D'altra parte i modelli animali che sviluppano tumori ossei non permettono di cogliere la fase critica iniziale della metastasi. Per questi motivi modelli tridimensionali sviluppati nel campo dell'ingegneria dei tessuti potrebbero essere un sistema importante per lo studio delle metastasi tumorali. Al fine di studiare i meccanismi cellulari e molecolari che governano la formazione di metastasi nel tessuto osseo, ci avvarremo di un modello di osso ingegnerizzato in vitro e di un modello murino di formazione di tessuto osseo ectopico. Entrambi i modelli sono stati sviluppati nel nostro laboratorio. I modelli consistono nella combinazione di cellule di origine mesenchimale con caratteristiche osteogeniche o osteoblasti differenziati ed appropriati biomateriali osteoinduttivi in grado di dare origine a tessuto osseo. I biomateriali hanno la funzione di fornire un supporto tri-dimensionale che consente l'attecchimento e l'aggregazione delle cellule impiantate. Il tessuto che si viene a differenziare in tali impianti ricapitola gli stadi dello sviluppo del tessuto osseo osservati in vivo, compreso il differenziamento da osteoblasti ad osteociti interconnessi all'interno di una matrice ossea mineralizzata. Questi modelli ci permetteranno, sia in vitro che in vivo, di studiare e caratterizzare le interazioni esistenti tra cellule tumorali in grado di generare metastasi ossee e il tessuto osseo.

*Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

Obiettivo generale del progetto è lo studio delle interazioni cellulari e del microambiente che si viene creare durante il processo di metastasi delle cellule tumorali nell'osso.

Verranno condotti esperimenti in vitro atti a riprodurre le interazioni esistenti tra microambiente mineralizzato e cellule tumorali. Le combinazioni di osteoblasti/biomateriali verranno utilizzate, in sistemi di co-culture tridimensionali con cellule tumorali al fine di analizzarne l'interazione e di isolare potenziali fattori coinvolti nel processo di metastatizzazione del tessuto osseo da parte di cellule neoplastiche.

Inoltre verrà effettuato l' impianto ectopico di combinazioni di osteoblasti/biomateriali in topi immunocompromessi e immunocompetenti singenici. Gli impianti verranno mantenuti nel topo per 8 settimane per permettere la completa formazione di un tessuto osseo organizzato all'interno dei pori dell'impianto. A tempi intermedi ai topi così impiantati verranno inoculate sistematicamente linee di cellule tumorali al fine di valutare l'attecchimento delle linee stesse nella zona di formazione di tessuto osseo. Gli impianti verranno poi analizzati al fine di studiare le interazioni fra cellule tumorali e osso ectopico (metastasi, isolamento di fattori rilasciati, isolamento e caratterizzazione di cellule presenti nell'impianto).

L'analisi dei campioni sarà fatta sia con tecniche di biologia cellulare, molecolare e morfologiche classiche, sia con tecniche di imaging avanzate (microscopia a deconvoluzione e microtomografia).

# Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

## *Impatto assistenziale certo o potenziale*

Lo sviluppo di un modello in vitro ed in vivo di "homing" ed invasione tumorale è potenzialmente di grosso aiuto nello studio dei meccanismi che guidano i processi metastatici, rendendo così possibile lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

## *Risultati e prodotti 2010*

Grazie alle loro proprietà differenziative ed immunosoppressive, le Cellule Staminali Mesenchimali derivanti dal midollo osseo (MSC) sono ad oggi considerate il candidato ideale per applicazioni di medicina rigenerativa ed ingegneria dei tessuti. Nonostante i risultati promettenti ottenuti nei primi trials clinici, nuove evidenze sperimentali indicano che, in determinate circostanze, tale popolazione cellulare sia in grado di promuovere o causare direttamente un processo tumorigenico. Dati precedentemente acquisiti nel nostro laboratorio dimostrano la formazione di osteosarcomi di derivazione dell'organismo ospite in seguito all'impianto ectopico di costrutti formati da MSC/biomateriali in un modello sperimentale di rigenerazione tissutale.

Sulla base dei dati preliminari acquisiti, ed utilizzando lo stesso modello sperimentale, nell'ultimo anno ci siamo focalizzati sullo studio delle singole componenti che possono giocare un ruolo critico nello sviluppo e nella progressione neoplastica. Innanzitutto, ci siamo chiesti se le modalità di espansione in vitro delle cellule progenitrici utilizzate per gli impianti siano in grado di influenzare la loro capacità di indurre tumori. In particolare, ci siamo focalizzati sul Fattore di Crescita dei Fibroblasti-basico (FGF-2), noto per avere un ruolo chiave nella proliferazione/differenziamento delle MSC. Cellule coltivate in presenza/assenza di tale fattore di crescita sono risultate essere in grado di indurre tumori intorno all'impianto, sebbene con tempistiche e caratteristiche differenti. Siccome l'FGF-2 è in grado di influenzare, sia in vitro sia in vivo, anche altri processi biologici, quali ad esempio la capacità di richiamare cellule endogene da parte delle MSC, abbiamo effettuato un'analisi microarray su campioni di MSC coltivate in presenza/assenza di tale fattore (MSC FGF+ e FGF-). E' stato possibile identificare in questo modo clusters di geni up-regolati nelle MSC FGF+ che appartengono a pathway coinvolti nella migrazione cellulare e nella modulazione della risposta immunitaria. Questo ci permette di ipotizzare che il processo tumorigenico a cui si assiste possa essere influenzato dalle modalità di espansione e selezione in vitro dei progenitori midollari, a loro volta in grado di richiamare ed attivare, nella zona della lesione, sottopopolazioni con caratteristiche differenti.

Per chiarire meglio quali siano i meccanismi coinvolti nella degenerazione tumorale specie-specifica fin qui osservata ed, in particolare, per verificare un eventuale coinvolgimento di oncovirus, abbiamo analizzato, tramite microscopia elettronica, biopsie delle diverse masse tumorali. Queste analisi ci hanno permesso di evidenziare presenza di particelle virali nelle cellule tumorali analizzate, ma non nelle MSC utilizzate, in associazione a biomateriali, per gli impianti ectopici. Tale risultato ci permette di ipotizzare che la degenerazione tumorale sia imputabile alla slatentizzazione di oncovirus naturalmente integrati nel genoma murino. La specie-specificità dei fenomeni osservati è stata inoltre confermata utilizzando, nello stesso modello sperimentale, Cellule Staminali derivanti da Liquido Amniotico (AFS) umane, il cui impianto non ha portato a fenomeni di degenerazione neoplastica.

## *Pubblicazioni*

El Backly R.M.-Cancedda R.

Bone marrow stem cells in clinical application: harnessing paracrine roles and niche mechanisms. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 123: 265/292, 2010

Mirabella T.-Poggi A.-Scaranari M.-Mogni M.-Lituania S.-Baldo C.-Cancedda R.-Gentili C.

Recruitment of host's progenitor cells to sites of human amniotic fluid stem cells implantation. *Biomaterials*, in press

Mirabella T.-Cilli A.-Carlone S.-Cancedda R.-Gentili C.

Amniotic liquid derived stem cells as reservoir of secreted angiogenic factors capable of stimulating neo-arteriogenesis in an ischemic phenotype. *Biomaterials*, in press

## *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

Sulla base dei risultati ottenuti, sarà nostro obiettivo indagare in modo più dettagliato i meccanismi che concorrono alla degenerazione tumorigenica osservata nel modello murino di rigenerazione ossea da noi sviluppato. In particolare, ci proponiamo di isolare mediante tecniche citofluorimetriche e caratterizzare citogeneticamente sia le popolazioni cellulari seminate sui biomateriali sia le popolazioni localizzate nella sede dell'impianto in seguito allo sviluppo del sarcoma, al fine di analizzare approfonditamente il microambiente tumorale a diversi stadi della progressione neoplastica.

Ci proponiamo inoltre di verificare l'eventuale correlazione esistente tra il numero di MSC impiantate e la formazione neoplastica, al fine di valutare se i dosaggi estremamente elevati di cellule utilizzati per studiare la formazione di tessuto osseo ectopico concorrono a ricreare un microambiente alterato in termini di rilascio fisiologico di fattori proliferativi e chemoattrattivi e pertanto proni alla formazione tumorale.

**29A, un nuovo trascritto della RNA polimerasi III in grado di indurre il differenziamento e inibire la malignità delle cellule di neuroblastoma**

*Linea di ricerca:* 3 - Ottimizzazione e personalizzazione delle strategie terapeutiche

*Programma:* a - Definizione del profilo di rischio individuale in pazienti con neoplasia in fase iniziale o avanzata

*Responsabile scientifico:* Aldo Pagano

# Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Sara Tavella

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* neuroblastoma; RNA polimerasi III; differenziamento; antiblastici

*Altri Enti coinvolti:* Dipartimento di Oncologia Biologia e Genetica, Università di Genova (M. Castelnuovo, S. Garritano, I. Penna, J. Bruzzone)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* diagnostica

*Soggetti cofinanziatori:* MIUR PRIN; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

## *Background*

Una serie di recenti esperimenti ci ha incoraggiato nello studio di una nuova molecola da noi scoperta (l'RNA non codificante 29A) come possibile agente in grado di differenziare i tumori e di provocarne la reversione ad un comportamento benigno. Abbiamo infatti chiaramente dimostrato che la sintesi di questo RNA guida le cellule di neuroblastoma ad un fenotipo differenziato non maligno e di tipo neurone-simile dove la cellula cancerosa riacquisce alcune delle capacità eccitatorie di una cellula nervosa normale. Utilizzando un modello murino abbiamo dimostrato anche in vivo la grande capacità di 29A di contrastare la malignità dei tumori e di riportare le cellule ad una crescita dipendente dall'ancoraggio, caratteristica che le cellule maligne avevano perso durante la loro trasformazione cancerosa.

## *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

In generale questo progetto ha come obiettivo il differenziamento del tumore neuroblastoma ad un fenotipo non maligno sfruttando l'azione di un RNA non codificante trascritto dall'RNA polimerasi (pol) III biologicamente attivo in questo tipo di cellule tumorali. Lo scopo finale di questa ricerca è quindi la messa a punto di una possibile terapia per il neuroblastoma basata sull'induzione del differenziamento delle cellule cancerose ad un fenotipo non maligno; tale terapia sarebbe da associare alle comuni terapie antiblastiche attualmente utilizzate contro il neuroblastoma. Nel dettaglio i nostri scopi sono: 1) l'identificazione dettagliata del ruolo giocato da 29A nell'inibizione della tumorigenesi, 2) l'identificazione di possibili farmaci in grado di promuovere una specifica attivazione dell'espressione di 29A, 3) la valutazione della correlazione quantitativa tra l'espressione di 29A, la malignità e la prognosi del tumore al fine di validare le misure dell'espressione di 29A come utili nella prognosi.

## *Impatto assistenziale certo o potenziale*

Gli aspetti realisticamente più promettenti di questo progetto sono legati a due possibili applicazioni dei nostri risultati: la prima è quella di un uso del livello di espressione di 29A quale marcatore di prognosi che indichi i possibili sviluppi del tumore e che suggerisca i livelli di farmaco da usare; la seconda è la possibilità di mettere a punto una terapia basata sull'induzione farmacologica dell'espressione di 29A che dovrebbe portare all'attacco di quelle cellule staminali del cancro che normalmente eludono l'azione dei farmaci antiblastici comunemente usati in terapia.

## *Risultati e prodotti 2010*

Nell'anno 2010 abbiamo generato nuove linee cellulari di neuroblastoma permanentemente transfettate con 29A con le quali abbiamo ripetuto gli esperimenti già effettuati sulla linea SKNBE2 al fine di analizzare il ruolo di 29A nella riduzione della malignità in diversi tipi di neuroblastoma. Tali linee clonali hanno permesso l'analisi dettagliata delle conseguenze dell'espressione di 29A sul

potenziale maligno di tumori di tipo totalmente diverso dal neuroblastoma, quali alcune carcinomi del colon e osteosarcomi, per valutare se ulteriori studi sull'azione di 29A (ed un suo possibile uso) siano da estendere anche a diverse altre forme di tumore. I risultati indicano un coinvolgimento di 29A nella malignità di diversi tipi tumorali rendendo questa molecola di RNA non-codificante estremamente interessante per ulteriori studi oncologici.

Come precedentemente pianificato ci siamo poi dedicati alla ricerca di un principio farmacologico in grado di attivare chimicamente la sintesi di 29A endogeno, vagliando una collezione di farmaci (Prestwick Library of Chemical Compounds) già validati per il loro utilizzo in terapia sull'uomo. Tale attività ha portato all'identificazione di due molecole particolarmente attive sulla trascrizione specifica di 29A a diversi dosaggi e/o tempi. Con questi studi abbiamo quindi identificato un modo di indurre farmacologicamente la sintesi intracellulare di una molecola utile al differenziamento delle cellule tumorali e capace di ridurre drasticamente la malignità di tumori umani impiantati in topo. Tali studi sono attualmente in corso e stanno delineando un possibile uso di nuove molecole come terapie atte a rendere le cellule tumorali estremamente suscettibili all'azione di farmaci antitumorali tradizionali determinando una inibizione della sintesi di specifiche "MultiDrugResistance" (MDR) proteins responsabili della bassa attività di alcuni farmaci antitumorali in alcune condizioni.

## *Pubblicazioni*

Castelnuovo M.-Massone S.-Tasso R.-Fiorino G.-Gatti M.-Robello M.- Gatta E.-Berger A.-Strub K.-Florio T.-Dieci G.-Cancedda R.-Pagano A.

An Alu-like RNA promotes cell differentiation and reduces malignancy of human neuroblastoma cells. FASEB J. 24:4033/4046, 2010

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Massone S.-Vassallo I.-Fiorino G.-Castelnuovo M.-Barbieri F.- Borghi R.-Tabaton M.-Robello M.-Gatta E.-Russo C.-Florio T.-Dieci G.-Cancedda R.-Pagano A.

17A, a novel non coding RNA, regulates GABA B alternative splicing and signaling in response to inflammatory stimuli and in Alzheimer disease.

Neurobiol. Dis. Epub Oct 1, 2010

Massone S.-Vassallo I.-Castelnuovo M.-Fiorino G.-Gatta E.-Robello M.-Borghi R.-Tabaton M.-Russo C.-Dieci G.-Cancedda R.-Pagano A.

The RNA polymerase III contribution to brain complexity and neurodegeneration.

J. Cell Biol., in press

Thellung S.-Corsaro A.-Villa V.-Simi A.-Vella S.-Pagano A.-Florio T.

Human PrP90-231-induced cell death is associated with intracellular accumulation of insoluble and protease-resistant macroaggregates and lysosomal dysfunction.

Cell Death Dis., in press

Massone S.-Ciarlo E.-Nizzari M.-Florio T.-Russo C.-Cancedda R.-Pagano A.

NDM29 promotes amyloid beta secretion favouring the amyloidogenic processing of Amyloid Precursor Protein (APP).

Molec. Neurodeg., resubmitted after revision

Vella S.-Conti M.-Tasso R.-Cancedda R.-Pagano A.

Dichloroacetate (DCA) Inhibits Neuroblastoma Growth by Specifically Acting against malignant undifferentiated cells.

Int. J. Cancer, resubmitted after revision

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

Nel corso del 2011 il nostro gruppo di ricerca intende approfondire la possibilità di un uso dell'espressione farmacologicamente indotta di 29A per favorire e potenziare l'attività di terapie anticancro già validate. Questa fase del lavoro sarà caratterizzata da una prima serie di esperimenti in vitro finalizzati a valutare su cellule di tipi tumorali diversi l'efficacia di questa combinazione di due terapie, quella utile all'espressione di 29A e quella anticancro.

Le due nuove molecole identificate saranno usate per pretrattare linee tumorali che verranno poi trattate con diversi dosaggi di 5-Fluorouracile, Paclitaxel e Cisplatino. Successivamente verranno valutati gli effetti sulla proliferazione e sulla vitalità cellulare a seguito del trattamento con antitumorali in condizioni di pretrattamento con le due nuove molecole o in condizioni di assenza di trattamento. I primi risultati preliminari fin qui ottenuti ci inducono a pensare che tale combinazione possa essere di grande utilità per le terapie anticancro.

Una seconda fase del lavoro del 2011 sarà incentrata sulla valutazione del potenziale uso delle due nuove molecole in combinazione con i farmaci antitumorali in tumori umani impiantati in topi NOD-SCID. A tale proposito un numero significativo di topi immunocompromessi verrà trapiantato con tumori umani (neuroblastomi) e trattato con cura farmacologica per indurre l'espressione di 29A in concomitanza con una cura anticancro tradizionale (paclitaxel, 5-fluorouracile, cisplatino) o, nei topi di controllo, in assenza di un trattamento pro-differenziativo che induca la sintesi di 29A. I risultati che ci attendiamo sulla base di quelli ottenuti in vitro ci inducono a pensare che il concomitante trattamento pro-29A e antiblastico dei tumori possa portare a un forte aumento dell'efficacia delle terapie anticancro su topi umani impiantati in topo.