



Collegio Ghislieri

Centro per la Comunicazione e la Ricerca

Progetto “Progressi in Biologia e Medicina”

12° Corso di formazione avanzata

**Le nicchie delle cellule staminali
somatiche normali e tumorali**

15-19 aprile 2013, Collegio Ghislieri, Pavia

A cura di Carlo Bernasconi

12° Corso di formazione avanzata

**Le nicchie delle cellule staminali
somatiche normali e tumorali**



Collegio Ghislieri

Centro per la Comunicazione e la Ricerca

Progetto “Progressi in Biologia e Medicina”

12° Corso di formazione avanzata

**Le nicchie delle cellule staminali
somatiche normali e tumorali**

15-19 aprile 2013, Collegio Ghislieri, Pavia

A cura di Carlo Bernasconi

© Copyright 2013  EDIMES
Edizioni Internazionali - Pavia

Edizioni Internazionali srl
Divisione EDIMES - Edizioni Medico-Scientifiche - Pavia

Via Riviera, 39 - 27100 Pavia
Tel. 0382526253 - Fax 0382423120
E-mail: edint.edimes@tin.it

Tutti i diritti sono riservati.
Nessuna parte può essere riprodotta in alcun modo
(compresi i microfilm e le copie fotostatiche)
senza il permesso scritto dell'editore.

Indice

Prefazione..... pag. IX

Premesse di biologia

1. La funzione di staminalità..... » 3
CarloAlberto Redi
2. Meccanismi dell'embriogenesi e oncogenesi molecolare..... » 9
CarloAlberto Redi
3. Il microambiente tumorale..... » 16
Carlo Bernasconi
4. Quiescent stem cells in intestinal homeostasis and cancer..... » 25
Riccardo Fodde

Cellule staminali somatiche normali e loro nicchie

5. Embriogenesi e identificazione delle cellule staminali organo-specifiche..... » 29
Manuela Monti
6. Le nicchie delle cellule staminali degli organi solidi..... » 37
Manuela Monti
7. Growth factors and tumour progression..... » 42
Ermanno Gherardi, Luisa Iamele, Hugo de Jonge

Fattori microambientali di progressione tumorale

8. Angiogenesis and antiangiogenesis in multiple myeloma..... » 51
Angelo Vacca, Domenico Ribatti
9. L'attivazione della coagulazione è un fattore critico di progressione tumorale?..... » 55
Anna Falanga
10. Infiammazione, immunità e progressione tumorale..... » 61
Paola Allavena

11. Meccanismi di fuga dall'immunità antitumorale e cellule staminali tumorali.....	» 67
<i>Giorgio Parmiani, Cristina Maccalli</i>	
12. Mesenchymal stromal/stem cells: support or suppress tumor growth?	» 72
<i>Massimo Dominici, Naomi D'Souza, Carlotta Spano, Paolo Paolucci, Giulia Grisendi</i>	
13. Extracellular matrix-dependent regulation of normal and pathological stem cell function.....	» 79
<i>Vittorio Abbonante, Alessandra Balduini</i>	

Il ruolo del microambiente nelle emopatie maligne

14. Il ruolo del microambiente nella leucemogenesi e nella progressione delle LAM.....	» 87
<i>Paolo Bernasconi, Marina Boni, Paola Maria Cavigliano, Irene Dambruoso, Barbara Rocca, Rita Zappatore, Celeste Calvello, Ilaria Giardini, Antonella Orlando, Marilena Caresana, Angela Pasi, Mirko Farina, Valeria Fiaccadori, Francesco Ripamonti</i>	
15. Intervento di fattori microambientali nell'evoluzione della LMC Ph1-pos.....	» 104
<i>Daniela Cilloni</i>	
16. Cellule staminali quiescenti e ricadute leucemiche tardive	» 108
<i>Paolo Bernasconi, Marina Boni, Paola Maria Cavigliano, Irene Dambruoso, Barbara Rocca, Rita Zappatore, Celeste Calvello, Ilaria Giardini, Antonella Orlando, Marilena Caresana, Angela Pasi, Mirko Farina, Valeria Fiaccadori, Francesco Ripamonti</i>	
17. Le nicchie midollari dopo trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche.....	» 117
<i>Francesco Frassoni</i>	
18. Il microambiente midollare nella patogenesi del mieloma multiplo.....	» 124
<i>Paolo Milani, Giampaolo Merlini</i>	
19. La fibrosi midollare nelle neoplasie mieloproliferative.....	» 132
<i>Mario Cazzola</i>	

Meccanismi della diffusione metastatica dei tumori solidi

20. La diffusione metastatica: un aggiornamento istopatologico..... » 139
Umberto Magrini
21. Meccanismi della diffusione metastatica dei tumori solidi..... » 143
Giannino Del Sal
22. La transizione epitelio-mesenchimale: passaggio cruciale
nel processo metastatico..... » 147
Sergio Marchini
23. Networks molecolari che regolano le metastasi tumorali..... » 151
Massimo Zollo
24. Cancer stem cells and metastasis: liaisons dangereuses..... » 155
Riccardo Fodde

Il ruolo del microambiente in tumori solidi

25. Quale ruolo ha il microambiente nella progressione
del carcinoma mammario?..... » 159
Angela Amato, Vittoria Fotia, Alberto Zambelli
26. Quale ruolo ha il microambiente nella progressione
del tumore del colon-retto?..... » 164
Enrico Giraudo

Nuove prospettive di terapia antitumorale

27. Terapia anti-angiogenetica: bersagli farmacologici
e combinazione con farmaci citotossici..... » 179
Stefano Fogli, Romano Danesi
28. From chemoprevention to target therapy:
the example of aspirin..... » 186
Andrea De Censi, Domenico Marra, Marilena Petrera
29. Farmaci immunomodulatori, microambiente
e nuovi bersagli molecolari..... » 191
Antonio Sica

Prefazione

Il concetto di “cellula staminale tumorale”, formulato sulla base di studi iniziati su cellule staminali leucemiche e proseguiti su cellule di tumori solidi, ha costituito l’acquisizione che maggiormente ha fatto progredire nell’ultimo decennio le nostre conoscenze sulla biologia dei tumori. Alle cellule staminali tumorali, vero bersaglio nella cura dei tumori, era stato riservato nell’aprile 2010 il nostro 9° Corso di formazione avanzata.

Tuttavia, nei riguardi della validità del concetto di cellula staminale tumorale come modello di crescita neoplastica sono state formulate negli ultimi anni alcune perplessità e controversie, derivanti soprattutto dal fatto che esso è stato impostato essenzialmente sulla base di ricerche sperimentali, che tengono poco conto del ruolo svolto dal microambiente tessutale dell’organismo ospite, nel quale la cellula staminale tumorale deve annidarsi per sopravvivere e crescere. Ecco quindi l’enorme lavoro di ricerca che negli ultimi anni è stato ed è riservato allo studio dei vari processi coinvolti nei rapporti che si stabiliscono fra cellule staminali tumorali mutate da una parte, e cellule normali del microambiente tessutale dell’ospite dall’altra. La comprensione di tali rapporti, che possono essere di opposizione e rigetto, oppure di accettazione e collaborazione costituisce la sfida di tutto questo lavoro di ricerca.

Quindi, le cellule staminali tumorali per annidarsi, sopravvivere e proliferare necessitano di un favorevole microambiente tessutale (nicchia). I meccanismi coinvolti in questo processo sono molteplici (induzione dell’angiogenesi, attivazione della coagulazione, intervento di macrofagi e stimolazione di processi infiammatori, alterazione della matrice extracellulare, risposta immune ed evasione dall’immunità antitumorale, ecc.), fra loro interdipendenti e correlati in modo complesso. Si è ritenuto quindi interessante esaminarli e discuterli in questo 12° Corso, anche perché l’insieme delle conoscenze, che si sono accumulate negli ultimi anni sull’intervento di fattori di nicchia nei meccanismi di progressione dei tumori, consente di avanzare alcune prospettive innovative nella strategia della cura dei tumori.

Collegi particolarmente qualificati in questo difficile settore di studi hanno generosamente risposto al nostro invito a partecipare alla realizzazione del Corso, non solo svolgendo le lezioni ma anche fornendo le sintesi scritte dei loro interventi, riunite nel presente volume. L’esperienza raccolta negli anni passati ci ha insegnato che questa serie di volumi costituisce una valida guida per i partecipanti ai corsi, e un’aggiornata fonte di informazioni per tutti coloro che vogliono approfondire le proprie conoscenze sugli specifici argomenti che di anno in anno vengono trattati. Quindi, desidero calorosamente ringraziare, a nome del Collegio Ghislieri e mio personale, tutti i Relatori del nostro 12° Corso di formazione avanzata.

Carlo Bernasconi

Pavia, 15 aprile 2013

PREMESSE DI BIOLOGIA

La funzione di staminalità

CarloAlberto Redi

Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Università di Pavia

Il Nobel 2012 per la fisiologia o la medicina è stato assegnato a Sir John Gurdon ed a Shinia Yamanaka con la seguente motivazione: "...for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent" (The Nobel Prize recognizes two scientists who discovered that mature, specialised cells can be reprogrammed to become immature cells capable of developing into all tissues of the body. Their findings have revolutionised our understanding of how cells and organisms develop.). Questa motivazione ben esprime, sotto il profilo della epistemologia genetica del termine "riprogrammare", il concetto sotteso alla nostra attuale conoscenza di che cosa sia in realtà "staminalità": una funzione! Una funzione assegnata alla cellula dall'ambiente in cui viene a trovarsi, la nicchia. E dunque essendo una funzione assegnata dal contesto spazio-temporale della nicchia è riprogrammabile in vitro, così come lo è in vivo nel corso della tumorigenesi; ed è la attuale capacità di riprodurre artificialmente eventi biologici che accadono in natura che ha portato nel corso degli anni I due grandi scienziati a raggiungere i risultati che vengono riconosciuti e premiati dal comitato del Karolinska che assegna il premio Nobel. Questa nuova visione è compatibile con la eterogenea massa di dati che sono stati accumulati negli ultimi vent'anni (Yeo e Ng, 2013) ed è capace di spiegare lo spostamento dell'equilibrio tra stato indifferenziato - stato differenziato in un senso e nell'altro (dedifferenziazione, che svolge un ruolo cruciale nella tumorigenesi). Se questa è la visione attuale (con lo stato di validità "temporanea" che la storia della biologia assegna a tutte le "presenti verità") è bene ripercorrere i passi salienti che hanno permesso di giungere a questa visione per una comprensione piena di questo nuovo paradigma. Per una visione completa si rimanda ai volumi precedenti di questa serie e comunque è bene iniziare da un lavoro del gruppo di Douglas Melton e Richard Mulligan (Harvard, Cambridge, Boston) dell'anno 2002 (Ramalho-Santos et al., 2002) i quali dimostrarono, con un approccio che solo a distanza di poco più di dieci anni può apparire naïve, che un semplice diagramma di Venn dei geni espressi da staminali embrionali, neuronali ed ematopoietiche presenta 216 espressi in comune: sono questi i geni "stemness". Circa il 10% di questi geni mappa sul cromosoma 17 del topo, cromosoma conosciuto per essere la sede di moltissimi geni legati allo sviluppo embrionale ed alla formazione delle cellule germinali maschili. Inoltre apparve subito chiaro che l'espressione genica delle staminali

ematopoietiche è più simile in assoluto a quella delle altre cellule del midollo osseo rispetto a quella di qualsiasi altro tipo cellulare (con ciò indicando una comune origine embrionale). Così come risultò chiara la somiglianza della espressione genica tra le embrionali e le neuronali rispetto a qualsiasi altro tipo cellulare con ciò indicando che la via di differenziazione “di base” per le staminali embrionali è quella di tipo neuronale. Chiaramente oggi sappiamo che il quadro delle relazioni funzionali tra i tanti geni che giocano un ruolo nella definizione dello stato di staminalità è ben più complesso e non vi sono solo vie gerarchiche di relazione lineare diretta (i cosiddetti “geni della staminalità”), con geni master e geni bersaglio, ma anche relazioni a “cespuglio”, con una architettura di relazione di tipo parallelo e multidirezionale, con loops e azioni-controreazioni sia positive sia negative, tutti sistemi di regolazione della espressione genica che si combinano variamente a determinare una “logica regolativa” capace di definire i vari gradi di potenza della staminalità (toti-, pluri-, multi-, unipotenza e stato differenziato; Holmberg e Perlmann, 2012), alla quale non è estranea neppure l’organizzazione sovramolecolare del DNA (Sha e Boyer, 2009). Inoltre, anche la combinata azione di fattori endogeni intrinseci alla cellula e di segnali estrinseci (citochine e fattori di crescita, ad esempio) entra ad innalzare ancora di più la possibile serie di combinazioni di espressione genica capace di regolare finemente lo stato di staminalità declinato nelle due variabili che maggiormente lo definiscono, il rinnovo e la pluripotenza: il che costituisce un secondo livello di regolazione della staminalità (Cha Y et al., 2010). Quest’ultimo livello di regolazione basato sulla relazione tra segnali extracellulari e intrinseche cascate trascrizionali è meno conosciuto poichè disponiamo di scarsi dati sulla cascata di segnali intracellulari capace di legare i due processi. Va comunque detto che sono ormai acquisiti dati estremamente solidi al riguardo, come quello che lega il rinnovo e la pluripotenza delle cellule staminali embrionali di topo alla azione combinata del fattore di inibizione della leucemia (LIF) con la via di Jak/Stat3: il segnale di pluripotenza mediato da LIF è iniziato dalla dimerizzazione di gp130 e del recettore di LIF (LIFR), dimerizzazione che accade nel momento immediatamente successivo al legame stesso di LIF e ciò attiva la tirosin-chinasi associata a Janus (JAKs). La forma attivata di JAKs fosforila i residui di tirosina nel dominio intracellulare di LIFR e di gp130 dove Stat3 viene legato e poi fosforilato (Kristensen et al., 2005). A seguire la forma fosforilata e poi dimerizzata di STAT3 viene traslocata all’interno del nucleo dove attiva vari geni bersaglio tra i quali c-Myc che anche da solo gioca diversi ruoli cruciali nel mantenere attiva la capacità di rinnovo delle cellule staminali embrionali (Cartwright et al., 2005). Considerando i ruoli cruciali della via di segnale di Jak/Stat3/c-Myc nel regolare il rinnovo ed in generale la pluripotenza diviene chiaro che debbono esistere diversi meccanismi di sorveglianza che regolano finemente l’attività di questa via di segnale verso la pluripotenza, meccanismi capaci di mantenere un regolare equilibrio di bilanciamento tra rinnovo e differenziazione cellulare specifici per ciascuna nicchia organo-specifica. Recentemente una di queste condizioni specifiche è stata individuata (Cha et al., 2010) ed è stato dimostrato sperimentalmente ciò che era atteso: come sia finemente controllata la via di segnale Jak/Stat3/c-Myc capace di mantenere

attiva la bilancia che regola l'equilibrio tra staminalità e differenziazione grazie all'azione di una catena proteica Z-70 associata ad una protein-chinasi (Zap70), una tirosin-chinasi della famiglia Syk (che è noto essere espressa nelle cellule pro/pre-B e nella tumorigenesi delle cellule B). È stato infatti dimostrato (Cha et al., 2010) che Zap70 è espressa nelle cellule staminali embrionali e che è capace di modulare la responsività (la competenza) delle cellule staminali embrionali al LIF. L'intreccio di relazioni mutualmente attivanti/silenzianti tra questi fattori determina la espressione di Zap70 attraverso due meccanismi, - una regolazione negativa del segnale di Jak1/Stat3 operato dalla fosfatasi SHP-1 e - una sovra-regolazione (upregulation) della espressione dei recettori di LIF: in altre parole, il mantenimento dello stato di staminalità nelle cellule staminali embrionali è dovuto all'azione inibente la eccessiva attività di Stat3.

Certamente non è un solo fattore quello che è in grado di assegnare la funzione di staminalità ad una cellula ma, come detto sopra, è un insieme di fattori presenti nell'ambiente in cui si viene a trovare la cellula a determinarne lo stato funzionale. Tra questi fattori, prossimali (chimica e fisica del microambiente) e distali (chimica dei segnali che giungono alla nicchia), un ruolo particolare è svolto anche da stimoli di tipo meccanico, stimoli da relazione strutturale con altre cellule presenti nella nicchia e capaci di determinare la persistenza nel tempo della cellula staminale nella nicchia. Così una particolare classe di proteine capace di determinare l'ancoraggio delle cellule alla nicchia viene a giocare uno di quei ruoli cruciali sopra ricordati nel determinare la funzione di staminalità. Sono queste le proteine Id (Niola et al., 2012) capaci di coordinare le attività delle cellule staminali neuronali nella nicchia ventricolare embrionale: la inattivazione di ben tre di questi geni della famiglia delle proteine Id determina la perdita dell'ancoraggio da parte delle staminali embrionali e la loro differenziazione. Le proteine Id reprimono la attivazione di Rap1GAP mantenendo così la attività GTPasica di RAP1 che è un mediatore fondamentale della adesione cellulare. Mantenedo così l'ancoraggio delle cellule staminali neuronali al microambiente extracellulare della nicchia le proteine Id sincronizzano le funzioni delle staminali neuronali alla loro residenza o uscita (differenziazione) dalla nicchia (Niola et al., 2012).

Di interesse per la comprensione della funzione staminalità è poi l'esame di un quadro comparativo a livello animale delle vie di regolazione dell'espressione genica che presiede alla staminalità (Davidson, 2010), ed anche la possibilità di seguire la migrazione delle cellule staminali al di fuori della nicchia (Snippert e Clevers, 2011) oltre, dopo il Nobel, alle diverse strategie di induzione della pluripotenza (Stadtfeld e Hochedlinger, 2010). Tra questi tanti e diversi interessi ha un posto di grande rilievo la domanda sul momento dello sviluppo embrionale in cui è possibile per la prima volta stabilire la comparsa di quei marcatori che segnano la potenza della staminalità ed il suo restringimento (da toti a pluri, da pluri a multi e così via); in altre parole il biologo delle staminali si chiede quanto precocemente sia possibile mettere in evidenza (e quali siano i geni master capaci di mettere in evidenza) la precoce transizione da totipotenza al restringimento di potenza della pluripotenza. Plachta e collaboratori (Plachta et al., 2011) hanno trovato nel gene OCT4 il marcatore tanto ricercato (per ora il solo trovato!) capace

di segnare in modo ineludibile il “destino” dei primissimi blastomeri, nella morula tra 4-8 blastomeri. Questi ricercatori dimostrano che solo quei blastomeri che mantengono una alta concentrazione nucleare di OCT4 sono in grado di dividersi asimmetricamente e di contribuire allo sviluppo del trofotoderma (in aggiunta ai blastomeri con un basso contenuto di OCT4) ed a quello delle cellule del nodo embrionale, le cere e proprie cellule staminali embrionali.

Per comprendere al meglio quello che è poi il fenomeno della riacquisizione della funzione di staminalità da parte di una cellula differenziata (ed a seguire, la possibile trasformazione neoplastica) vale la pena di ricordare quello che è il significato del termine staminale, così legato alla derivazione etimologica. Grazie a questa riflessione diviene più facile capire il legame sempre più chiaro tra staminalità e origine della trasformazione neoplastica. Il termine staminale rende l'inglese staminal, a sua volta un neo-latinismo (non è mai esistito in lat. un agg. *staminalis, -e!) creato in ambiente scientifico anglosassone su materiale latino. Alla base della forma vi è, comunque, il lat. STAMEN, -INIS, sost. ntr. formato da due distinti morfemi, - la base lessicale (di origine indeuropea) *sta- “stare saldamente collocato; stare; - il morfema derivazionale (di origine indeuropea) *-men-, usato ampiamente per la formazione di sostantivi indicanti, inizialmente, il prodursi dell'effetto di un'azione e poi, per traslato, l'effetto dell'azione stessa. Qualche esempio, tratto dal latino: ag-men “l'esercito in marcia”; lu-men “il bagliore della luce” (vs. lux “la luce, vera e propria); ful-men, il bagliore precedente il tuono; cri-men, l'azione del separare/selezionare e poi, per traslato, l'oggetto della selezione; se-men, inizialmente, l'azione del seminare, poi, ciò che si semina. STAMEN è dunque inizialmente un termine tecnico della tessitura ed indica l'ordito, del tessuto (lett. “ciò che sta fermamente saldo”), sul quale si sovrappone la trama, a formare il tessuto nella sua forma finale. Poi indica più in generale “il filo” e, con valore traslato, “il filo della vita; il destino; la sorte; lo stame della vita”. Ciò che è importante notare, nel valore semantico di lat. stamen, è l'idea (astratta) di qualche cosa che “sta fermo, stabilmente”, che vale quale “principio di fondo, basilare”. Da qui cellula staminale, basilare, fondante. E purtroppo i dati di queste ultime decadi suggeriscono una capacità fondante anche nel corso della riacquisizione della funzione di staminalità nel corso della trasformazione neoplastica con il concetto di “cellula staminale cancerosa”. Lo studio dei marcatori di superficie che caratterizzano le cellule staminali e quelli delle cellule neoplastiche in vari tipi di tumori ha portato dunque così a ribadire un concetto assai datato, quello dell'esistenza delle cellule staminali del tumore (Reya et al., 2001; Reya e Clevers, 2005). A questo proposito il lettore deve riferirsi ad un documento prodotto e pubblicato dall'*European Molecular Biology Organization* (EMBO), del 2006, che tratta in modo completo ed esaustivo il tema. La pubblicazione ha per titolo: “La ricerca sulle cellule staminali: risultati, prospettive, prerequisiti” ed è scaricabile gratuitamente all'indirizzo: <http://www.embo.org/index.php>. Tra i tanti capitoli di interesse ve ne è uno dedicato alle Cellule Staminali Cancerose (CSC) trattato da uno dei maggiori esperti a livello internazionale, Riccardo Fodde dell'Università di Leiden (Fodde, 2006). Le CSC derivano probabilmente dalla loro controparte normale attraverso mutazioni che alterano le vie di trasdu-

zione del segnale nelle cellule (esempio, le vie di Wnt, Hedgehog e Notch), note per regolare finemente questo bilancio. L'ipotesi delle CSC rappresenta oggi un concetto molto innovativo nella biologia del cancro con profonde e fondamentali implicazioni per la clinica. La ricerca sulle CSC si muoverà in parallelo con quella sulle normali cellule staminali embrionali e somatiche. Maggiori dettagli e informazioni possono essere desunte dal sito di *MCSCs* (l'acronimo sta per "Migrating Cancer Stem Cells"), il sito del consorzio europeo di scienziati interessati allo studio delle CSC coordinato da Riccardo Fodde (www.mcscs.eu). Lo scopo principale del consorzio è lo studio dei meccanismi molecolari e cellulari sottesi all'iniziazione, allo stabilirsi ed al propagarsi del cancro. A questo proposito una semplice ricerca nella rete metterà in evidenza una gran quantità di lavori, con ciò segnalando la grande aspettativa che deriva da questi studi. Una citazione tra tante meritevoli può essere data al riguardo di un ruolo svolto da una delle proteine più studiate per mille altri motivi (con ciò si vuole segnalare la rilevanza di approcci interdisciplinari), la p53. A lungo considerata come il "guardiano del genoma," può fare ben di più che contrastare le mutazioni capaci di causare la trasformazione neoplastica alla base della tumorigenesi. Può anche impedire che le cellule tumorali più aggressive continuino a proliferare come CSC e riescano ad iniziare programmi genetici di reversione verso il fenotipo di cellule staminali "normali" (Mizuno et al., 2010).

Di grande rilievo per il futuro del lavoro di ricerca sarà poi la possibilità di ricreare artificialmente delle nicchie capaci di sfruttare al massimo le possibilità funzionali (crescita - rinnovo - differenziazione) delle cellule staminali con la costruzione di microambienti ingegnerizzati (Marx, 2013) con proprietà biochimiche e biofisiche tali da assicurare l'interazione meccanica e chimica più adatta a conferire alle cellule la funzione di "staminalità"!

Bibliografia

1. Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*. 2005; 132: 885-896.
2. Cha Y, Moon BH, Lee MO, Ahn HJ, Lee HJ, Lee KA, Fornace AJ, Kim KS, Cha HJ, Park KS. Zap70 functions to maintain stemness of mouse embryonic stem cells by negatively regulating Jak1/Stat3/c-Myc signaling. *Stem Cells*. 2010; 28: 1476-1486.
3. Davidson EH. Emerging properties of animal gene regulatory networks. *Nature*. 2010; 468: 911-922.
4. Fodde R. Stem cells and metastatic cancer: fatal attraction? *PLoS Med* 3 (12): e482. doi:10.1371/journal.pmed.0030482, 2006.
5. Holmberg J, Perlmann T. Maintaining differentiated cellular identity. *Nat Rev Genetics*. 2012; 13: 429-439.
6. Kristensen D, Kalisz M, Nielsen J. Cytokine signalling in embryonic stem cells. *APMIS*. 2005; 113: 756-772.
7. Marx V. Where stem cells call home. *Nature Methods*. 2013; 10: 111-5.

8. Mizuno H, Spikec BT, Wahle GM, Levine AJ. Inactivation of p53 in breast cancers correlates with stem cell transcriptional signatures. *PNAS*. 2010; 107: 22745-22750.
9. Niola F, Zhao X, Singh D, Castano A, Sullivan R, Lauria M, Nam HS, Zhuang Y, Benezra R, Di Bernardo D, Iavarone A, Lasorella A. Id proteins synchronize stemness and anchorage to the niche of neural stem cells. *Nat Cell Biol*. 2012; 14: 477-487.
10. Plachta N, Bollenbach T, Pease S, Fraser SE, Pantazis P. Oct4 kinetics predict cell lineage patterning in the early mammalian embryo. *Nat Cell Biol*. 2011; 13: 117-123.
11. Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 2002; 298: 597-600.
12. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414: 105-111.
13. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005; 434: 843-850.
14. Snippert HJ, Clevers H. Tracking adult stem cells. *EMBO reports*. 2011; 12: 113-122.
15. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev*. 2010; 24: 2239-2263.
16. Yeo JC, Ng HH. The transcriptional regulation of pluripotency. *Cell Res*. 2013; 23: 20-32.
17. Sha K, Boyer LA. The chromatin signature of pluripotent cells, *StemBook*, ed. The Stem Cell Research Community, <http://www.stembook.org>, 2009.

Meccanismi dell'embriogenesi e oncogenesi molecolare

CarloAlberto Redi

Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Università di Pavia

Il titolo di questa relazione, voluta dal Prof. Carlo Bernasconi con la consueta capacità di cogliere aspetti di grande stimolo concettuale, può provocare una certa inquietudine poichè associa, nella sottesa similitudine dei meccanismi, un processo di formazione di un nuovo individuo con un processo capace della sua distruzione. Ma tant'è! Già dal titolo informa i partecipanti di un fatto straordinario emerso negli ultimi anni dell'avanzamento delle conoscenze della Biologia molecolare dello sviluppo: non solo similitudine ma anche comunanza di meccanismi che presiedono alla regolazione dei due processi (per una review si veda Kelleher et al., 2006). Questa è la attuale visione dei due fenomeni - della ontogenesi delle fasi embrionali preimpianto e - dello svilupparsi della crescita neoplastica così come emerge dalla Biologia dello sviluppo nel momento del suo passaggio paradigmatico da scienza storico-ontologica della descrizione del vivente (sebbene ormai a livello molecolare) a scienza della sintesi del vivente: il cancro può originarsi per l'alterazione dei programmi genetici di sviluppo che presiedono ai repentini cambiamenti di forma e struttura che occorrono nel corso dello sviluppo embrionale (ben modellizzati matematicamente dalla teoria delle catastrofi, Farkas, 2001).

Va precisato subito però che oggi si è ottenuta una conferma, a livello molecolare, di una idea che va molto indietro negli anni: sviluppo embrionale e sviluppo del tumore sono due facce della stessa medaglia. A questo proposito vorrei ricordare come una rivista internazionale di ottimo livello scientifico sia del tutto dedicata a questo tema: il sottotitolo dell'*Int. J. Developmental Biology* recita infatti: "linking Development, Stem cells and Cancer Research"! ed è infatti del tutto dedicato a lavori che trattano la relazione tra queste tre parole chiave. Inoltre ha di recente dedicato uno special issue a questo tema, dal titolo: "Invasion in cancer and embryonic development" e curato da Marc Mareel e Juan Aréchaga, 2004; tutti i lavori ivi pubblicati sono di riferimento. Le "somialianze" biologiche tra tumori ed embrioni ed il fatto che cancro e sviluppo embrionale siano legati tra loro è infatti una idea che ha ben più di cento anni e si deve all'embriologo scozzese John Beard (1858-1924) il quale con il solo ausilio del microscopio descrisse le similarità del comportamento delle cellule del trofoblasto e di quelle dei tumori:

invasività, diffusione, capacità di formare vasi e, noi oggi aggiungeremmo, capacità di sopprimere le difese immunitarie. Beard giunse così a formulare la teoria trofoblastica del cancro ed a proporre una terapia enzimatica del cancro (“enzimi proteolitici del pancreas”, Beard, 1902, 19011), con documentate remissioni di malattia, basandosi sulla coincidenza temporale dell’apparizione dei granuli di zimogeno nel pancreas fetale con la trasformazione delle cellule del trofoblasto da “maligne” a cellule ben differenziate. Osservazioni che non sono rimaste isolate negli anni, anche se la teoria di Beard è stata dimenticata attorno agli anni trenta del secolo scorso, ma al contrario hanno ricevuto più di una conferma, anche in anni recenti (Mullen, 1998). In particolare una delle previsioni della teoria trofoblastica del cancro, la produzione di gonadotropine corioniche da parte delle cellule tumorali di qualsivoglia cancro, in similitudine alla capacità delle cellule del trofoblasto di produrre HCG, è stata dimostrata in anni recenti dal gruppo di Hernan Acevedo e pubblicata sull’autorevole rivista *Cancer* (Acevedo et al., 1995; Acevedo e Hartssock, 1996). Una conferma ulteriore è poi venuta dal gruppo di Carlo Ferretti (Ferretti et al., 2006) con la dimostrazione che le cellule del trofoblasto e quelle neoplastiche impiegano le medesime circuiterie geniche per proliferazione, migrazione e invasione dei tessuti circostanti. La segnalazione di Beard che non tutte le primitive cellule germinali giungono ad invadere il mesoderma della gonade indifferenziata ma alcune si disperdono nell’organismo è ripresa poi dalla teoria delle Cellule Staminali del Cancro (CSC) che tanto interesse ha oggi-giorno. La teoria CSC postula infatti che esista una piccolissima frazione di cellule tumorigeniche, capaci di iniziare e sostenere la progressione cancerosa a partire da una singola cellula (in piena analogia con la teoria di Beard; Burleigh, 2008) sulla base di un modello di evoluzione clonale stocastica capace di spiegare la evidente eterogeneità delle cellule tumorali (Tomasson, 2009). Queste assunzioni hanno una grande rilevanza teorica per la possibilità di concepire come bersaglio terapeutico una piccolissima frazione di cellule. All’incirca trent’anni fa il cancro costituiva una scatola nera di cui ben poco si riusciva a comprendere; è merito di Robert Weinberg (professore di Biologia - introductory biology! - al MIT di Boston ed uno dei padri fondatori dell’Istituto Whitehead per la ricerca biomedica; un sito che va regolarmente consultato per la qualità dell’informazione presentata: <http://wi.mit.edu/>) l’aver identificato nei primi anni ’80 del secolo scorso (Shih e Weinberg, 1982; Tabin et al., 1982) il primo gene capace di causare un tumore (l’oncogene RAS) ed il primo gene soppressore di tumori (il gene RB, capace di conferire suscettibilità familiare al tumore pediatrico dell’occhio). Da quel momento sono stati trovati centinaia di geni associati a tumori riuscendo ad identificare (grazie ad un “datamining” di bioinformatica avanzata) quelli che sempre si presentano attivi in ogni tipo di tumore (Douglas e Weinberg, 2000). Questa identificazione ha permesso di meglio aggredire concettualmente anche il fenomeno della diffusione del tumore grazie alla formazione di metastasi (la causa di circa il 90% delle morti per cancro, Chaffer e Weinberg, 2011). Sino a pochi anni orsono si riteneva che tutte le cellule che costituiscono un tumore fossero equivalenti tra loro: oggi sappiamo che questa affermazione non è più valida (Douglas e Weinberg, 2000; Lobo et al., 2007). All’interno di un tumore esistono diverse tipologie

di cellule tumorali, una vera e propria gerarchia di “tumorigenicità” con alcune cellule ben più potenti sotto il profilo della clonogenicità e capaci di diffondere nell’organismo ospite sino a rispondere ad alcuni segnali di “homing” in distretti anche lontani dai quali si sono originate, e lì di nuovo dar luogo ad una incontrollata proliferazione ed invadere i tessuti circostanti (Chaffer e Weinberg, 2011). Sono queste delle micro-metastasi che per buona sorte il più delle volte non evolvono in tumore poiché regrediscono non riuscendo a moltiplicarsi (per ragioni che ancora non siamo in grado di capire completamente). Purtroppo, sebbene in rare occasioni, una di queste micro-metastasi riesce a svilupparsi in nuovo tumore: e sempre in questi casi ciò è dovuto al fatto che nelle cellule che compongono il nuovo tumore si sono accese le vie di espressione genica attive nel corso delle prime fasi dello sviluppo embrionale; a loro volta queste espressioni geniche si devono al fatto che le cellule tumorali sono state in grado di esprimere proprio i fattori di trascrizione che regolano le prime fasi dello sviluppo embrionale. L’accensione di questi geni permette quindi alle cellule tumorali di acquisire le stesse proprietà delle cellule embrionali: movimento, capacità invasiva, resistenza all’apoptosi, secrezione di enzimi litici capaci di ledere i tessuti circostanti (Chaffer e Weinberg, 2011). L’altissimo numero e la grande variabilità di geni e proteine attive in una cellula tumorale ha per lungo tempo scoraggiato e reso quasi inaffrontabile il problema della ricerca di bersagli terapeutici. Ora però la nuova visione dei due processi (i.e., sviluppo embrionale e sviluppo di un tumore) che la Biologia dello sviluppo ha prodotto permette di disegnare protocolli di ricerca per la identificazione di quel piccolo numero di geni comuni alla gran parte dei tumori (e che funge da regolatore centrale della modulazione di espressione genica di una intera coorte di geni “responder”) così da semplificando (per quanto possa sembrare irrealistica la affermazione) la ricerca oncologica promettendo nuove opportunità terapeutiche proprio grazie alla strategia che da questa opportunità si rende disponibile: giungere a controllare l’espressione di quei due, tre, quattro (comunque un numero limitatissimo) geni capaci di orchestrare la complessa “coreografia” genetica dell’alto grado di malignità di un tumore. Tutto ciò in analogia con il controllo genico delle prime fasi dello sviluppo embrionale. Se sino agli inizi degli anni ’80 era una pura speculazione ritenere che un tumore originasse per il danneggiamento funzionale di alcuni geni, nelle due decadi successive le tante omiche che declinano le nostre attuali conoscenza biologiche del vivente hanno permesso di aprire quella scatola nera e perlomeno di capire come un tumore si origina: esattamente impiegando ed attivando (di nuovo) le stesse circuiterie geniche che presiedono allo sviluppo embrionale pre-impianto. Numerosi studi hanno messo in evidenza la relazione tra i programmi genici che presidono al normale sviluppo organogenetico e la malignità dei tumori (Rivera e Haber, 2005; Scotting et al., 2005; Stiewe, 2007). Ciò è ben dettagliato considerando - il grado di staminalità (pluripotenzialità: potenza proliferativa e differenziativa) e - la condivisione di:

- struttura della cromatina,
- fattori di trascrizione,
- espressione genica (Naxerova et al., 2008).

Inoltre altri studi hanno evidenziato l'arricchimento degli stessi moduli (set) genici in cellule staminali somatiche, embrionali e tumori della mammella, della prostata e nei glioblastomi scarsamente differenziati (Ben-Porath et al., 2008; Wong et al., 2008). Ancor più di rilievo, il gruppo di Isaac S. Kohane (Harvard - MIT Division of Health Sciences and Technology, Boston, USA) analizzando tumori dei più svariati tessuti ha da un lato confermato che i geni sempre attivi in tutti i tipi di tumori sono proprio quelli che regolano le prime fasi dello sviluppo embrionale e fetale e che si riattivano anziché rimanere silenti per il resto della vita e dall'altro lato che la malignità dei tumori considerati è raggruppabile in tre classi caratterizzate ciascuna dalla precocità di espressione genica nel corso dello sviluppo embrionale (Naxerova et al., 2008): in altre parole i tumori più maligni sono quelli in cui sono attivi i geni che più precocemente si esprimono nel corso dello sviluppo embrionale, il che attribuisce loro una formidabile capacità di predizione diagnostica. Ad esempio considerando i tumori dei polmoni sia la malignità dei tumori, sia il tempo di sopravvivenza dei pazienti sono ben identificati da specifici gruppi di geni in relazione alla loro precocità di espressione nel corso dello sviluppo embrionale. E questa caratteristica associazione si dimostra vera anche per altri tipi di tumori: comparando circa quaranta tipi di tumori e condizioni precancerose contro i tempi dello sviluppo embrionale nei quali sono attive specifiche attività di espressione genica è possibile raggruppare in tre classi di malignità anche tumori molto diversi tra loro (Ben-Porath et al., 2008; Naxerova et al., 2008). Tra i tumori caratterizzati dalle espressioni geniche più precoci dello sviluppo embrionale è possibile riscontrare l'adenocarcinoma polmonare, l'adenoma del colon-retto, alcuni tipi di tumori della tiroide ed i limfomi dei linfociti T. I tumori più aggressivi di questa classe sono poi quelli che appaiono, sotto il profilo citologico, meno differenziati e più "embrionali", certamente quelli caratterizzati dai geni della staminalità embrionale così che quei tumori (I più aggressivi e indifferenziati sotto il profilo citologico) sono proprio quelli caratterizzati da cellule del tipo staminale embrionale. I tumori con attività di espressione genica tipiche del terzo trimestre di sviluppo fetale o di quello neonatale tendono ad essere tumori a lenta progressione (cancro della prostata e dell'ovaio, displasia del fegato). Questi dati non solo informano sulla biologia del cancro ma permettono anche di ideare strategie terapeutiche basate sul silenziamento genico, ad esempio pensando di impiegare molecole capaci di interferire con la espressione di uno specifico gene; meglio ancora, se una molecola ha dimostrato di avere attività farmacologica contro un tipo di tumore (perché silenzia un determinato gene) di una delle tre classi di Kohane, ebbene si può pensare di provarne la efficacia anche contro altri tipi di tumori di quella stessa classe (poiché verosimilmente caratterizzati dal profilo dell'espressione di quel gene). Se è sempre più chiaro che il cancro è in ultima analisi causato e controllato dall'attivazione dei programmi di sviluppo embrionale è ancora campo di grande dibattito se questo fatto sia l'estrema conseguenza dell'accadere di mutazioni che colpiscono, deregolandole, le circuiterie geniche preposte al controllo dello stato differenziato. Una altra rilevante evidenza sulla similitudine dei meccanismi dell'embriogenesi e della crescita neoplastica è quella scoperta dal gruppo di Lloyd Old con la dimostrazione che una intera classe di

antigeni, chiamati CT (Cancro/Testicolo), è espressa da cellule tumorali e gameti mettendo così in luce che un comune programma genetico è sotteso alla crescita neoplastica ed alla gametogenesi (per una recente review si veda Parmigiani et al., 2006). Più di 90 geni producono i rispettivi RNA messaggeri solo ed esclusivamente in cellule tumorali e nelle cellule germinali maschili. La alta specificità degli antigeni CT ne fa degli ideali bersagli di un potenziale vaccino contro il cancro o di una terapia basata su anticorpi anti-CT. Le caratteristiche biologico-molecolari dello sviluppo embrionale si sono dunque rivelate particolarmente simili a quelle che caratterizzano la gran parte dei tumori (Kelleher et al., 2006; Lobo et al., 2007), così come l'embriologia sperimentale e la biologia dei tumori hanno messo in evidenza ed in prospettiva questa realtà non sorprende pensando che le circuiterie di espressione genica che regolano e governano questi due processi sono quelle (stesse) che controllano proliferazione e differenziamento cellulare. Alla base, al cuore, di questa comunanza si situano da un lato la transizione epitelio - mesenchimale (EMT) che marca l'evento cruciale delle prime fasi dello sviluppo embrionale, la gastrulazione con l'origine del classico "terzo foglietto" embrionale, dall'altro l'attivazione delle vie di segnale controllate dai geni Wnt, Hedgehog, Notch, PAR e BMP (Mani et al., 2008). È ormai ben dissezionato il meccanismo molecolare alla base della EMT con la messa in evidenza che ad attivare la EMT sono due fattori di trascrizione (Zinc-finger Enhancer Binding, ZEB1 e ZEB2) capaci di stimolare la motilità cellulare, prevenire l'apoptosi e a conferire proprietà staminali alle cellule mentre a bloccare la EMT sono i membri della famiglia di microRNA miR-200 capaci di indurre la differenziazione epiteliale: è dunque un circuito di feedback tra ZEB7 miR-200 quello che regola la EMT e la progressione cancerosa verso le metastasi controllando lo stato delle cellule staminali cancerose (Brabletz e Brabletz, 2010). Molto probabilmente sarà la conoscenza delle diverse fasi di progressione cancerosa segnate dalle lievi ma progressive transizioni della trasformazione EMT ad indicare nuove possibilità terapeutiche così come recenti dati paiono indicare (Van Denderen e Thompson, 2013) anche sulla base della semplice osservazione che la gran parte dei tumori umani nell'adulto sono carcinomi i quali è ben noto originano per l'abnorme crescita delle cellule epiteliali che rivestono la superficie e le cavità di organi come la mammella, il colon, i polmoni ed il fegato.

Anche il doppio ruolo giocato nello sviluppo embrionale e nel cancro da parte delle vie di espressione di alcuni geni chiave è stato oggetto di intensi studi (e.g., la via di segnale Wnt, Peifer e Polakis, 2000, e BMP, Simic e Vukicevic, 2007) in una varietà di tumori umani. La conoscenza di questi meccanismi permetterà certamente nei prossimi anni di guadagnare grandi spazi terapeutici e di controllare la attuale mortalità di alcuni tipi di cancro sino a renderli delle malattie croniche (si legga l'interessante "A glimpse of the next 100 years in Medicine", Kohane et al., 2012) ma deve risultare chiaro che l'innegabile successo che già abbiamo conquistato nella cura e nel trattamento di alcuni tipi di tumori (e in quello che sapremo acquisire grazie alla biologia molecolare dello sviluppo) non possono farci dimenticare che la vittoria più consistente la guadagneremo con la prevenzione più che con il trattamento terapeutico: il rischio di morire di cancro, oggi circa 1:5

per le popolazioni occidentali, potrà essere abbassato sino ad 1:10: dipende fondamentalmente dal nostro stile di vita (non fumo, restare magri, esercizio fisico, poca carne rossa - molti vegetali - benessere!).

Bibliografia

1. Acevedo HF, Hartsock RJ. Metastatic phenotype correlates with high expression of membrane-associated complete beta-human chorionic gonadotropin in vivo. *Cancer*. 1996; 78: 2388-2399.
2. Acevedo HF, et al. Human chorionic gonadotropin-beta subunit gene expression in cultured human fetal and cancer cells of different types and origins. *Cancer*. 1995; 76: 1467-1475.
3. Beard J. Embryological aspects and etiology of carcinoma. *Lancet*. 1902; 1: 1758.
4. Beard J. The enzyme treatment of cancer. London: Chatto & Windus. 1911.
5. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet*. 2008; 40: 499-507.
6. Brabletz S, Brabletz T. The ZEB/miR-200 feedback loop - a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO reports*. 2010; 11: 670-677.
7. Burleigh AR. Of germ cells, trophoblasts, and cancer stem cells. *Integr Cancer Ther*. 2008; 7: 276-281.
8. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011; 331: 1559-1564.
9. Douglas H, Weinberg, RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.
10. Farkas M. Dynamical models in biology. Academic press, London. 2001.
11. Ferretti C, Bruni L, Dangles-Marie V, Pecking AP, Bellet D. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Human Reproduction Update Advance Access*, doi:10.1093/humupd/dml048, 2006.
12. Kelleher FC, Fennelly D, Rafferty M. Common critical pathways in embryogenesis and cancer. *Acta Oncologica* 2006; 45: 375-388.
13. Kohane IS, Drazen JM, Campion EW. A glimpse of the next 100 years in medicine. *N Engl J Med*. 2012; 367: 2538-2539.
14. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007; 23: 675-699.
15. Mareel M, Aréchaga J. Preface to special issue "Invasion in cancer and embryonic development". *Int J Dev Biol*. 2004; 48: 351-353.
16. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008; 133: 704-715.
17. Mullen CA. Review: analogies between trophoblastic and malignant cells. *Am J Reprod Immunol*. 1998; 39: 41-49.
18. Naxerova K, Bult CJ, Peaston A, Fancher K, Knowles BB, Kasif S, Kohane IS.

- Analysis of gene expression in a developmental context emphasizes distinct biological leitmotifs in human cancers. *Genome Biol.* 2008; 9: R108.
19. Parmigiani RB, Bettoni F, Vibranovski MD, Lopes MH, Martins WK, Cunha IW, Fernando A, Soares FA, Simpson AJ, de Souza SJ, Camargo AA. Characterization of a cancer testis (CT) antigen gene family capable of eliciting humoral response in cancer patients. *PNAS.* 2006; 103: 18066-18071.
 20. Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science.* 2000; 287: 1606-1609.
 21. Rivera MN, Haber DA. Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5: 699-712.
 22. Shih C, Weinberg RA. Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell.* 1982; 29: 161-169.
 23. Simic P, Vukicevic S. Bone morphogenetic proteins: from developmental signals to tissue regeneration. *EMBO reports.* 2007; 8: 327-331.
 24. Scotting PJ, Walker DA, Perilongo G. Childhood solid tumours: a developmental disorder. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5: 481-488.
 25. Stiewe T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7: 165-168.
 26. Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, Weinberg RA, Papageorge AG, Scolnick EM, Dhar R, Lowy DR, Chang EH. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature.* 1982; 300: 143-149.
 27. Tomasson MH. Cancer stem cells: a guide for skeptics. *J Cell Biochem.* 2009; 106: 745-749.
 28. Van Denderen BJ, Thompson EW. The to and fro of tumour spread. *Nature.* 2013; 493: 487-488.
 29. Wong DJ, Liu H, Ridky TW, Cassarino D, Segal E, Chang HY. Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008; 2: 333-344.

Il microambiente tumorale

Carlo Bernasconi

Già Professore Ordinario di Ematologia, Università di Pavia e Direttore della Divisione di Ematologia dell'IRCCS Policlinico San Matteo.

Consulente Ematologo presso l'IRCCS Fondazione "Salvatore Maugeri", Pavia.

Presidente Collegio Ghislieri

Lo straordinario aumento delle conoscenze sui tumori, avvenuto nell'ultimo decennio, ha portato a riconoscerli come strutture molto complesse, alla cui insorgenza e accrescimento concorrono non solo le necessarie mutazioni di cellule staminali che acquisiscono il carattere neoplastico, ma anche l'intervento di componenti specializzate del normale tessuto mesenchimale che generano il "microambiente tumorale".

Gli studi che hanno aperto la strada a queste conoscenze sono stati dapprima condotti in ambito ematologico e successivamente, utilizzando analoghe modalità di indagine (soprattutto di ordine genetico e molecolare), in un largo spettro di tumori solidi.

L'attuale visione interpretativa di un tumore contrasta fortemente con il precedente quadro, piuttosto riduttivo, del cancro come semplice raccolta di cellule tumorali relativamente omogenee, la cui intera biologia potrebbe essere capita chiarendo unicamente le proprietà intrinseche di queste cellule. Per contro, noi oggi innanzitutto sappiamo che le cellule tumorali sono funzionalmente eterogenee (solo poche nel contesto di un tumore hanno la capacità di automantenersi, sono cioè cellule tumorali "staminali"); inoltre sappiamo che esistono parecchi tipi cellulari normali, di origine mesenchimale, che concorrono a formare il microambiente tessutale (nicchia) necessario alla sopravvivenza e sviluppo delle cellule staminali tumorali.

Queste cellule mesenchimali normali specializzate intervengono in vari processi (neoangiogenesi, emocoagulazione, infiammazione, immunità) che contribuiscono in modo determinante a comporre la biologia di molti tumori.

Del tutto recentemente, sono stati poi molto rapidi i progressi nella conoscenza dei meccanismi di metastatizzazione di un tumore, in particolare per quanto riguarda la formazione di nicchie pre-metastatiche, favorenti l'insediamento di cellule staminali tumorali circolanti (che se dovessero rimanere in circolo verrebbero distrutte). Tali progressi hanno portato alla formulazione di alcuni concetti generali per inquadrare la biologia dei tumori. Al riguardo, particolarmente interessante appare la rielaborazione della vecchia ipotesi del "seme e suolo", che serve a ben illustrare i meccanismi di formazione del clone neoplastico (il "seme") e il

concorso di un microambiente (il “suolo”) adatto alla crescita e metastatizzazione di un tumore (Fidler, 2003; Sleeman et al., 2012).

Con l'intento di trattare in modo ordinato, e possibilmente completo, i vari eventi che avvengono nel microambiente tumorale, considerando anche i molteplici fattori cellulari e umorali che li determinano e le loro possibili interferenze, è necessario esaminare brevemente i seguenti processi: induzione dell'angiogenesi, attivazione dell'emocoagulazione, intervento delle cellule dello stroma e ruolo dell'infiammazione, risposta immune e meccanismi di fuga dall'immunità anti-tumorale.

Induzione dell'angiogenesi

La neovascolatura associata ad un tumore, generata dal processo di angiogenesi, provvede alle necessità di fornire al tessuto tumorale materiale nutritivo e ossigeno, e di smaltire scorie metaboliche e CO₂, analogamente a quanto avviene per i tessuti normali. Durante l'embriogenesi lo sviluppo del sistema vascolare comporta la nascita di nuove cellule endoteliali e la loro disposizione in forma di tubi (“vasculogenesi”), nonché la gemmazione di nuovi vasi da quelli esistenti (“angiogenesi”). Seguendo questo schema morfogenetico, la vascolatura normale diventa presto quiescente, e in un soggetto adulto per provvedere alla guarigione di ferite o a necessità fisiologiche (come il ciclo riproduttivo nelle femmine) si riattiva l'angiogenesi, ma solo in modo transitorio. Per contro, durante la progressione tumorale, lo “switch” angiogenico rimane quasi sempre attivato, causando una continua gemmazione di nuovi vasi a sostegno della crescita neoplastica (Hahnan e Folkman, 1996).

È stato sicuramente accertato che lo switch angiogenico è governato da fattori contrapposti, che inducono o inibiscono l'angiogenesi (Baeriswyl e Christofori, 2009). Alcuni di questi regolatori angiogenici sono proteine di segnale, che si legano a recettori stimolatori o inibitori disposti sulla superficie delle cellule endoteliali vascolari. Sono oggi ben conosciuti i prototipi di questi induttori e inibitori dell'angiogenesi; essi sono rispettivamente il *vascular endothelial growth factor-A* (VEGF-A) e il *thrombospondin-1* (TSP-1).

Il gene VEGF-A codifica ligandi che sono coinvolti nel governare la crescita di nuovi vasi sanguigni durante lo sviluppo embrionale e postnatale, e poi nell'adulto nel regolare la sopravvivenza omeostatica delle cellule endoteliali e la neoangiogenesi in situazioni fisiologiche e patologiche. Tre recettori tirosinchinasici (VEGFR-1 -2 -3) regolano questa via di segnale a parecchi livelli, a dimostrazione della sua complessità. Così, l'espressione del gene VEGF può essere iper-regolata sia dall'ipossia che da segnali di oncogeni (Ferrara, 2009); inoltre, i ligandi VEGF possono essere sequestrati nella matrice extracellulare in forma latente, e essere sottoposti a rilascio ed attivazione da parte di una proteasi degradante la matrice extracellulare (ad es. la MMP-9) (Kessenbrock et al., 2010). Infine, a sostenere l'angiogenesi tumorale possono intervenire altri segnali proangiogenici, come quelli derivati da membri della famiglia dei fattori di crescita fibroplastici (FGF), quando la loro espressione è cronicamente iperregolata (Baeriswyl e Christofori, 2009).

I vasi sanguigni prodotti internamente ad un tumore da un insieme sbilanciato di segnali proangiogenici sono tipicamente aberranti: la neovascolatura tumorale è caratterizzata da una precoce gemmazione capillare, una arborizzazione vasale convoluta ed eccessiva, vasi distorti ed allargati, flusso ematico disordinato, microemorragie, aumento della permeabilità, livelli abnormi di proliferazione ed apoptosi delle cellule endoteliali (Nagy et al., 2010).

I periciti sono un'importante componente della vascolatura tessutale normale; essi sono strettamente addossati alla superficie esterna dei tubi endoteliali, e svolgono un'azione di supporto meccanico e fisiologico nei confronti delle cellule endoteliali. Per contro, la vascolatura associata ad un tumore veniva descritta come fortemente carente in queste cellule ausiliarie; tuttavia, studi microscopici più recenti hanno dimostrato che i periciti sono associati, anche se meno saldamente, alla neovascolatura di molti tumori (Raza et al., 2010) e sono molto importanti per mantenere la funzionalità della vascolatura tumorale.

È poi da ricordare che una serie di tipi cellulari originanti dal midollo osseo svolgono un ruolo cruciale nell'angiogenesi patologica (Qian e Pollard, 2010). Questi comprendono cellule dell'immunità innata (in particolare, macrofagi, neutrofilii, mastociti, progenitori mieloidi), che infiltrano le lesioni premaligne e i tumori in progressione, e si accumulano ai margini di tali lesioni. Le cellule infiammatorie peritumorali aiutano a far scattare lo switch angiogenico in un tessuto precedentemente quiescente, e a sostenere l'iniziale angiogenesi associata alla crescita tumorale, oltre che facilitarne l'invasione locale. Inoltre, è stato osservato che diversi tipi di progenitori endoteliali derivati dal midollo osseo in certi casi migrano al di dentro delle lesioni neoplastiche, e si intercalano nella neovascolatura come periciti o cellule endoteliali (Patenaude et al., 2010).

Durante il graduale sviluppo dell'invasione tumorale l'angiogenesi viene indotta molto precocemente, sia nei modelli sperimentali che nell'uomo. L'esame istologico di lesioni premaligne non-invasive, come le displasie ed i carcinomi in situ di vari organi, hanno dimostrato una precoce attivazione dello switch angiogenico (Raicha et al., 2009). In passato si riteneva che l'angiogenesi intervenisse in modo importante solo quando ormai il tumore fosse in una fase di crescita macroscopica, mentre i dati più recenti indicano che un'angiogenesi attivata svolge un ruolo importante anche nella fase microscopica pre-maligna della progressione neoplastica, comportandosi come un vero marcatore del cancro (Hanahan e Weinberg, 2011).

Attivazione dell'emocoagulazione

È ben nota da tempo in clinica la frequente insorgenza di trombosi nel decorso di tumori maligni (Young et al., 2012). Trombosi e cancro sono legati da numerosi meccanismi fisiopatologici; la frequenza di tromboembolismi venosi e delle loro recidive è nettamente superiore in pazienti affetti da tumore rispetto ad altri gruppi di ammalati.

Episodi tromboembolici costituiscono la seconda più frequente causa di morte (dopo il tumore stesso) in pazienti con cancro, ma può anche rappresentare l'esor-

dio clinico in ammalati con tumore occulto. I fattori di rischio per un tromboembolismo venoso correlato ad un cancro sono il tipo di tumore, la chemioradioterapia, la chirurgia e l'uso di cateteri venosi centrali; solo ultimamente sta emergendo in clinica l'impiego di predittori di tromboembolie per i singoli individui. L'accertato impatto del tromboembolismo venoso sulla mortalità precoce nei pazienti con cancro ha fatto rivolgere particolare attenzione al problema se la terapia anticoagulante possa migliorare la sopravvivenza a lungo termine di questi ammalati, attraverso un diretto intervento sui meccanismi della biologia tumorale. Recenti studi dimostrano infatti che l'attivazione del sistema coagulativo sostiene la progressione e la metastatizzazione tumorale.

È in accordo con tale osservazione il dato dell'espressione di fattori procoagulanti (innanzitutto il *tissue factor*, TF) da parte delle cellule tumorali, che correla con una prognosi sfavorevole in parecchi tipi di tumore (Palumbo e Degen, 2007). Il TF (conosciuto anche come fattore III della coagulazione o CD142) è il recettore proteasico che inizia la coagulazione dopo una ferita, attraverso la via estrinseca. In normali condizioni fisiologiche l'espressione di TF è limitata alle sedi extravascolari, che divengono esposte solo dopo un trauma; in questo caso il TF esposto si lega al fattore VII del plasma sanguigno, lo attiva e dà inizio alla cascata di eventi proteolitici che portano alla formazione di trombina, attivazione di piastrine e deposito di fibrina.

Oltre che avviare la coagulazione, il legame FVIIa-TF attiva vie di segnale intracellulari attraverso il dominio citoplasmatico di TF, attivando *protease activated receptors* (PARs) accoppiati alla proteina G, specie PAR2. Queste vie di segnale sostengono l'angiogenesi e la progressione tumorale (Versteeg et al., 2008). Le vie di segnale intracellulari possono essere distinte sperimentalmente dal ruolo coagulativo extracellulare di TF mediante anticorpi specifici o con delezione del dominio citoplasmatico, che elimina molte forme di segnale TF mentre rimane invariata l'attivazione della coagulazione.

Il TF aumenta l'angiogenesi e l'accrescimento tumorale; a tal riguardo è da ricordare che svolge un ruolo importante in alcuni modelli sperimentali di metastasi ematogene. Nel topo l'inibizione di TF riduce le metastasi. Per contro, l'espressione di TF da parte delle cellule tumorali si accompagna ad un incremento del loro potenziale metastatico (Milsom et al., 2008); infatti, cellule cancerose metastatiche possono esprimere livelli di TF sino a mille volte più elevati rispetto a cellule cancerose non metastatiche, e cellule staminali tumorali esprimono i livelli più alti di TF (Milsom et al., 2007).

L'attivazione della trombina è un critico gradino comune nella cascata coagulativa e costituisce un fattore importante nella determinazione del processo metastatico. Il potenziale metastatico di cellule tumorali in modelli murini può essere diminuito mediante una diretta o indiretta inibizione della trombina, ottenuta attraverso varie modalità (deficit di protrombina o di fibrinogeno, inibizione delle piastrine, azione della trombomodulina endoteliale, ecc.) (Horowitz et al., 2011). Tutti questi dati suggeriscono che il potenziale metastatico TF-correlato si svolge attraverso la trombina e la proteolisi mediata dalla trombina, e che l'attivazione della trombina attraverso vie diverse può stimolare anche il potenziale metastatico.

Negli ultimi anni sono stati identificati parecchi meccanismi attraverso i quali le piastrine, la trombina e la fibrina possono essere di supporto al processo metastatico. Di particolare interesse al riguardo sono i recenti studi condotti da Gill-Bernabè et al. (2012), utilizzando come modello sperimentale topi SCID iniettati con cellule di una linea ottenuta da melanoma umano; tali studi per la prima volta sono riusciti a dimostrare i legami fra coagulazione indotta da TF e reclutamento di macrofagi per la formazione della nicchia pre-metastatica. Il reclutamento di monociti/macrofagi (cioè di cellule normali di origine osteomidollare) da parte della coagulazione TF-indotta si svolgerebbe con le seguenti modalità: il TF espresso sulle cellule tumorali attiva la cascata coagulativa causando la formazione di trombina, l'attivazione di piastrine e il deposito di fibrina; il coagulo formato sulle cellule tumorali recluta un sottotipo di monociti/macrofagi (caratterizzato dall'espressione di CD11b, CD68, F4/80 e CX3CR1, ma non di CD11c), che sono essenziali per la formazione della nicchia pre-metastatica e per la sopravvivenza in vivo delle cellule tumorali; la prevenzione della coagulazione mediante inibizione di TF o della trombina porta ad un diminuito reclutamento di monociti/macrofagi, con effetto inibitorio anche sulla formazione di nicchie premetastatiche e sulla sopravvivenza delle cellule tumorali; il blocco della funzione dei monociti/macrofagi (ottenuta nel topo mediante deplezione di cellule CD11b) porta alle stesse conseguenze, nonostante rimanga inalterata la formazione del coagulo, dimostrando che il reclutamento di macrofagi funzionali è essenziale per la sopravvivenza delle cellule tumorali. Comunque, risulta evidente che l'anticoagulazione inibisce il reclutamento macrofagico e previene la progressione metastatica associata alla formazione di nuove nicchie.

Intervento delle cellule dello stroma e ruolo dell'infiammazione

I vari tipi di cellule stromali che costituiscono il microambiente tumorale possono essere reclutate dal tessuto normale adiacente, la più ovvia riserva di tali tipi cellulari. Tuttavia, in questi ultimi anni il midollo osseo ha assunto sempre maggiore importanza come sorgente chiave delle cellule stromali associate ad un tumore (Bergfeld e DeClerck, 2010; Hanahan e Weinberg, 2011). È stato dimostrato che cellule staminali e progenitori mesenchimali transitano dal midollo osseo nel tumore, dove si possono differenziare in vari tipi di cellule stromali con specifici compiti funzionali (ad es. macrofagi, periciti, fibroblasti tumore-associati, ecc.). Alcune di queste cellule di origine midollare possono anche persistere in uno stadio indifferenziato o parzialmente differenziato, esibendo quindi funzioni che mancano nella loro progenie più differenziata.

L'origine midollare dei diversi tipi di cellule stromali è stata dimostrata usando topi con tumore trapiantato, nei quali le cellule del midollo osseo, e quindi tutte le cellule da loro derivate, sono state preventivamente e selettivamente marcate con una proteina fluorescente. Mentre era noto da tempo che le cellule infiammatorie immuni derivassero dal midollo osseo, solo recentemente è stata osservata la possibile derivazione osteomidollare di periciti e di vari tipi di fibroblasti cancro-associati. Quindi, i dati sperimentali sino ad ora raccolti indicano che le cellule

dello stroma tumorale possono essere rifornite al tumore in accrescimento dalla proliferazione di cellule stromali preesistenti, mediante differenziazione in situ di cellule staminali/progenitori originanti nei tessuti vicini normali, oppure attraverso il reclutamento di cellule staminali/progenitori derivati dal midollo osseo. Un problema ancora non risolto riguarda invece l'importanza di progenitori endoteliali midollari per l'angiogenesi tumorale (Fang e Salven, 2011).

L'acquisizione che le cellule staminali mesenchimali (MSCs) vengono reclutate all'interno di un tumore ha originato negli ultimi anni un grande interesse per lo studio delle funzioni svolte dalle MSCs nei tumori. Per condurre questi studi, parecchi gruppi di ricerca hanno utilizzato un'ampia varietà di modelli sperimentali tumorali, cui sono state aggiunte MSCs immoificate per determinare l'impatto sullo sviluppo tumorale. Nonostante la grande quantità di lavoro svolto, i risultati sinora ottenuti sono però contraddittori, con alcuni ricercatori che hanno trovato che le MSCs promuovono la crescita tumorale, mentre altri ricercatori hanno riportato che le MSCs inibiscono la crescita tumorale (v. la rassegna di Klopp et al., 2011). I meccanismi che dai vari autori sono stati indicati come responsabili dei dati osservati sono molteplici: intervento di chemochine e citochine, modulazione dell'apoptosi, supporto vascolare, controllo della risposta immune. La ragione della grande contraddizione dei risultati raccolti non è nota; essa può essere solo in parte attribuita alla diversità dei modelli sperimentali, ma soprattutto è probabile che al riguardo assumano particolare importanza la grande eterogeneità delle MSCs e l'ampio spettro della loro potenzialità differenziativa. Si tratta certamente di un argomento di estremo interesse, perché riuscire a capire le condizioni in cui le MSCs possono inibire o favorire la crescita e la metastatizzazione di un tumore è cruciale, sia per conoscere il ruolo dello stroma tumorale nella carcinogenesi, sia per poter impostare eventuali terapie innovative dei tumori con l'impiego di MSCs ma con la necessaria sicurezza per i pazienti.

È noto da tempo in clinica che processi infiammatori cronici possono precedere l'insorgenza di tumori, mentre i patologi hanno descritto l'associazione di abbondanti infiltrati infiammatori a tumori anche iniziali. Più di recente sono poi state condotte numerose ricerche sui rapporti fra infiammazione e patogenesi del cancro, con la produzione di numerose e convincenti dimostrazioni di importanti effetti funzionali favorevoli allo sviluppo e la progressione tumorale esercitati dal processo infiammatorio (DeNardo et al., 2010; Qian e Pollard, 2010; Grivennikov et al., 2010). Le cellule infiammatorie possono contribuire a generare questi effetti fornendo molecole bioattive al microambiente tumorale (compresi fattori di crescita che sostengono segnali proliferativi, fattori anti-apoptosi che limitano la morte cellulare, fattori pro-angiogenici, enzimi che modificano la matrice extracellulare e facilitano l'invasione e le metastasi) e inducendo segnali che portano alla transizione epitelio-mesenchimale e ad altri programmi di progressione e invasione tumorale. È ancora importante sottolineare che l'infiammazione è in alcuni casi evidente nei primi stadi della progressione neoplastica ed è capace di favorire il passaggio di una incipiente neoplasia in un tumore completamente sviluppato (Qian e Pollard, 2010).

Risposta immune e meccanismi di fuga dall'immunità antitumorale

La classica teoria dell'immuno-sorveglianza è basata sul principio che le cellule e i tessuti siano continuamente monitorati da un sistema immune sempre allertato, e quindi che tale immuno-sorveglianza sia responsabile del riconoscimento e dell'eliminazione della maggior parte delle cellule di un tumore incipiente. Quindi, in accordo con questa teoria, i tumori solidi che si sviluppano hanno in qualche modo evitato di essere identificati dai vari meccanismi della risposta immune, o almeno hanno limitato la completa eliminazione immunologica.

In campo sperimentale, quando topi geneticamente ingegnerizzati per essere deficienti di varie componenti del sistema immune vengono utilizzati per lo sviluppo di tumori indotti da carcinogeni, è stato osservato che i tumori insorgono più frequentemente e/o crescono più rapidamente negli animali immunodeficienti rispetto ai controlli immunocompetenti. In particolare, deficit dello sviluppo o funzione dei linfociti T citotossici (CTLs), dei Th1 helper o delle cellule natural killer (NK) portano - considerati singolarmente - ad un aumento nell'incidenza dei tumori; inoltre, topi con immunodeficienze combinate sia delle cellule T che delle cellule NK sono ancor più suscettibili allo sviluppo di tumori. Questi risultati indicano che, almeno in certi modelli sperimentali, sia l'immunità innata che l'immunità cellulare indotta contribuiscono al processo di immuno-sorveglianza antitumorale (Teng et al., 2008).

Anche in clinica è stata segnalata l'esistenza di risposte immuni antitumorali in alcune forme di cancro umani (Nelson, 2008; Bindea et al., 2010; Ferrone e Dranoff, 2010). Per esempio, pazienti con tumori del colon e dell'ovaio che all'esame istologico presentano un abbondante infiltrato di CTLs e cellule NK hanno una migliore prognosi rispetto a quelli che mancano di tale abbondanza di linfociti killer (Nelson, 2008; Pagès et al., 2010). Inoltre, in alcuni soggetti sottoposti a trapianto d'organo e prolungata immunosoppressione è stata osservata l'insorgenza nei riceventi di tumori derivati dai donatori, suggerendo che nei donatori apparentemente liberi da neoplasie cellulari staminali tumorali erano presenti in uno stato quiescente, controllate da un sistema immune completamente funzionante (Strauss e Thomas, 2010).

Recentemente è stato dimostrato che cellule tumorali potenzialmente immunogeniche possono evitare la distruzione immune, disattivando meccanismi immunologici indirizzati alla loro distruzione.

Per esempio, cellule tumorali possono paralizzare i CTLs e le cellule NK secernendo TGF- β o altri fattori immunosoppressivi (Yang et al., 2010; Shields et al., 2010); meccanismi più sottili operano attraverso il reclutamento di cellule infiammatorie attivamente immunosoppressive, come le cellule T regolatrici (Tregs) e cellule immunosoppressive derivate dal midollo osseo; entrambi questi tipi cellulari sopprimono l'azione dei T linfociti citotossici (Mougiakakos et al., 2010).

Certamente, una maggior comprensione dei meccanismi di fuga dalla sorveglianza immune costituisce oggi uno dei più interessanti argomenti nello studio dei complessi rapporti fra immunità e sviluppo dei tumori nell'uomo.

Bibliografia

1. Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2009; 19: 329.
2. Bergfeld SA, DeClerck YA. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Res.* 2010; 29: 249.
3. Bindea G, Mlecnik B, Fridman WH, et al. Natural immunity to cancer in human. *Curr Opin Immunol.* 2010; 22: 215.
4. DeNardo DG, Andreu P, Coussens LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 2010; 29: 309.
5. Fang S, Salven P. Stem cells in tumor angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol.* 2011; 50: 290.
6. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29: 789.
7. Ferrone C, Dranoff G. Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 4045.
8. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 453.
9. Gill-Bernabè AM, Serjancić S, Tialka M, et al. Recruitment of monocytes/macrophages by tissue factor-mediated coagulation is essential for metastatic cell survival and premetastatic niche establishment in mice. *Blood.* 2012; 119: 3164.
10. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation and cancer. *Cell.* 2010; 140: 883.
11. Hanahan D, Folkman J. Patterns of emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996; 86: 353.
12. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144: 646.
13. Horowitz NA, Blevins EA, Miller WM, et al. Thrombomodulin is a determinant of metastasis through a mechanism linked to the thrombin binding domain but not the lectin-like domain. *Blood* 2011; 118: 2889.
14. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z, et al. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010; 141: 52.
15. Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, et al. Concise review. Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells.* 2011; 29: 11.
16. Milsom C, Anderson GM, Weitz JI, et al. Elevated tissue factor procoagulant activity in CD133-positive cancer cells. *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 2550.
17. Milsom C, Yu JL, Mackam N, et al. Tissue factor regulation by epidermal growth factor receptor and epithelial-to-mesenchymal transitions: effect of tumor initiation and angiogenesis. *Cancer Res.* 2008; 68: 10068.
18. Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, et al. Regulatory T. cells in cancer. *Adv. Cancer Res.* 2010; 107: 57.
19. Nagy JA, Chang SH, Shih SC, et al. Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin. Thromb. Hemost.* 2010; 36: 321.

20. Nelson BH. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol Rev.* 2008; 222: 101.
21. Palumbo JS, Degen JL. Mechanisms linking tumor cell-associated procoagulant function to tumor metastasis. *Thromb Res.* 2007; 120: S22.
22. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, et al. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene.* 2010; 29: 1093.
23. Patenaude A, Parker J, Karsan A. Involvement of endothelial progenitors cells in tumor vascularization. *Microvasc Res.* 2010; 79: 217.
24. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010; 141: 39.
25. Raicha M, Cimpean AM, Ribatti D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur. J. Cancer.* 2009; 45, 1924.
26. Raza A, Franklin MJ, Dudek AZ. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am J Hematol.* 2010; 85: 593.
27. Shields JD, Kountis IC, Tomei AA, et al. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science* 2010; 328: 749.
28. Sleeman JP, Christofori G, Fodde R, et al. Concept of metastasis in flux: the stromal progression model. *Sem Cancer Biol.* 2012; 22: 174.
29. Strauss DC, Thomas JM. Transmission of donor melanoma by organ transplantation. *Lancet Oncol.* 2010; 11: 790.
30. Teng MWL, Swann JB, Koebel CM, et al. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J Leukoc Biol.* 2008; 84: 988.
31. Versteeg HH, Schaffner F, Kerver M, et al. Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth. *Blood.* 2008; 111: 190.
32. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* 2010; 31: 220.
33. Young A, Chapman O, Connor C, et al. Thrombosis and cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* Adv. online pub. 10 July 2012.

Quiescent stem cells in intestinal homeostasis and cancer

Riccardo Fodde

Erasmus Medical Center, Josephine Nefkens Institute, Rotterdam

Adult stem cell niches are characterized by a dichotomy of cycling and quiescent stem cells: while the former are responsible for tissue turnover, their quiescent counterparts are thought to become active upon tissue injury thus underlying the regenerative response. Moreover, quiescence prevents adult stem cells from accumulating mutations thus ensuring a reservoir of unaltered stem cells. In the intestine, while cycling stem cells were shown to give rise to the main differentiated lineages, the identity of their quiescent equivalents remains to date elusive. This is of relevance for conditions such as Crohn's disease and ulcerative colitis where quiescent stem cells may underlie metaplasia and the increased cancer risk associated with chronic inflammation. Tumours are thought to share a comparable hierarchical structure of adult tissues with pluripotent and self-renewing cancer stem cells (CSCs) giving rise to more differentiated cellular types. As such, neoplastic lesions may encompass both cycling and quiescent CSCs. Because of their infrequent cycling, quiescent CSCs are refractory to chemo and radiotherapy and are likely to play a role in tumour dissemination, dormancy and recurrence.

Reference

Roth S, Fodde R. Quiescent stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Cell Communication & Adhesion*, Early Online, 1, 2011, Informa Healthcare USA, Inc.

**CELLULE STAMINALI SOMATICHE
NORMALI E LORO NICCHIE**

Embriogenesi e identificazione delle cellule staminali organo-specifiche

Manuela Monti

Centro di Ricerche in Medicina Rigenerativa, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

In passato si assumeva che, se danneggiati, molti tessuti (ad esempio del sistema nervoso, pancreas, cuore) non fossero più in grado di auto rigenerarsi in quanto privi di cellule staminali (CS) endogene. Oggi, invece, sappiamo che la gran parte degli organi (se non tutti, Preston et al., 2003; Rodriguez-Porcel et al., 2009), è sede di CS organo-specifiche che garantiscono una capacità di riparazione rigenerativa nei tessuti adulti.

Nella gran parte dei vertebrati, gli organi si formano attraverso un processo a due fasi: a) durante la embriogenesi si ha la formazione di organo anatomicamente immaturo, anche se il più delle volte già funzionale; b) durante la forma adulta con la “maturazione” ed acquisizione delle caratteristiche anatomiche tipiche dell’organo adulto. Questa seconda fase avviene durante il periodo di sviluppo post-embriionale, all’incirca nel periodo pre- post-nascita (ad esempio nell’uomo e nel topo), caratterizzato inoltre dalla formazione e maturazione delle CS organo-specifiche. I dati di cui disponiamo sono però inconclusivi e a volte controversi, soprattutto se riferiti a due principali aspetti della fisiologia delle CS organo-specifiche: mantenimento e senescenza di una riserva originale di CS ereditata nel corso della embriogenesi e stato di multipotenza.

Il meccanismo generalmente accettato per spiegare l’origine delle CS organo-specifiche è quello che suggerisce di individuare, in qualche fase della ontogenesi di uno specifico organo, l’origine delle CS in grado di mantenersi attive durante l’intero ciclo vitale di un individuo poiché capaci di insediarsi in quella particolare regione anatomica (microambiente, nicchia; Arai e Suda, 2008) dotata di speciali caratteristiche strutturali (composizione e costituzione) e fisiologiche (metaboliche) nonché adatta a mantenere le caratteristiche delle CS stesse (Hsu e Fuchs, 2012). Recentemente, alcuni dati sperimentali hanno portato però alla elaborazione di un secondo meccanismo atto a definire l’origine delle CS. Queste ultime osservazioni sono di diversa tipologia ed includono dati che contro argomentano quelli a sostegno del meccanismo generalmente accettato, quali:

- le CS organo-specifiche vanno incontro a senescenza;
- le CS organo-specifiche circolano nell’organismo e non sono ristrette solo ad uno specifico organo;

- le CS simili alle cellule staminali embrionali (ES-like) sono presenti nell'organismo adulto (ne è prova la formazione di teratomi, tumori composti dai derivati dei tre foglietti embrionali);
- nell'organismo adulto le gonadi possono essere la sede di cellule ES-like pluripotenti.

Per la propria validità, questo secondo meccanismo implica l'esistenza di una sorgente di cellule ES-like esterna all'organo a cui appartengono le CS organo-specifiche. Solo in tal modo sarebbe possibile assicurare il mantenimento dei compartimenti di CS somatiche nel corso della vita dell'organismo adulto. Inoltre, queste cellule ES-like debbono essere caratterizzate da pluripotenza, avere un tempo di vita medio illimitato, capacità di circolare liberamente in qualsiasi distretto anatomico del corpo ed essere dotate di efficienti meccanismi di riparo delle mutazioni a carico degli acidi nucleici. Di particolare rilievo per la validità del modello è il postulare che debba esistere, per le cellule ES-like, una specifica sede in uno specifico organo del corpo adulto, dove le ES-like vanno incontro a divisioni asimmetriche capaci di generare una "vera" cellula ES-like ed una che, circolando nell'organismo, entra nella riserva delle CS organo-specifiche ed è "committed" a divenire cellula progenitrice (progenitor cell). È ben noto che sia segnali intrinseci sia segnali estrinseci regolano il destino di tutte le cellule staminali: i più conosciuti tra questi regolatori sono i fattori secreti della famiglia TGFβs e Wnts e le vie di espressione genica mediate, tra gli altri, dai geni Oct4, Stat3, Sox2 e Nanog (Chambers et al., 2003; Watt e Hogan, 2000). Grazie a segnali di "homing" liberati dalle nicchie organo-specifiche, queste ultime cellule attivano l'espressione di geni che sono "lineage-specific" e che permettono loro di riconoscere un particolare organo ove si insediano e ripopolano quella specifica nicchia di cellule CS, differenziandosi in quelle che riconosciamo come cellule CS organo-specifiche. Le gonadi (sia il testicolo sia l'ovario) sono, nella visione sottesa a questo secondo meccanismo, i naturali candidati per essere le sedi della sorgente esterna di cellule ES-like nell'organismo adulto (Xie, 2008 e bibliografia ivi citata).

Le CS organo-specifiche sono cellule multipotenti (e non pluripotenti come ancora molti testi insistono a riportare: pluripotenti sono le cellule staminali embrionali, totipotente lo zigote) essenziali allo sviluppo degli organi dell'adulto e coinvolte nel mantenimento, riparo e rigenerazione tissutale. Le proprietà che caratterizzano le CS sono la capacità di auto-rinnovarsi e, come già riportato, la caratteristica di multipotenza. Ad esempio, infatti, le CS 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. In situ, le CS organo-specifiche sono anche caratterizzate da un basso tasso di replicazione (ciclo cellulare molto lento) e si ritrovano confinate in regioni specializzate dell'organo, le nicchie delle CS, nicchie ambientali particolarmente ipossiche che conferiscono loro una lunga sopravvivenza. Di particolare rilievo per la piena comprensione della biologia delle cellule staminali è la recentissima chiarificazione dei requisiti metabolici delle CS e delle cellule differenzianti (Ta-

kubo et al., 2013; Yu et al., 2013), risultati ottenuti per ora solo sul sistema ematopoietico ma che nell'immediato futuro dovranno essere estesi ad altri sistemi di CS per verificarne la generale validità (che ora pare molto probabile comunque, come insegna la storia della Biologia e della Medicina). Takubo e colleghi (2013) hanno dimostrato che le CS adottano un metabolismo basato sulla glicolisi anaerobica per la produzione di energia mentre Yu et al. (2013) hanno dimostrato che le cellule che entrano nella via differenziativa necessitano del più efficiente meccanismo mitocondriale della fosforilazione ossidativa per la produzione di ATP. Interessante il fatto che le CS adottino un meccanismo meno efficiente di produzione di molecole di ATP ma privo di produzione di molecole reattive di ossigeno, fatto questo che assicura loro protezione contro la possibilità di accumulare danni genetici e che controbilancia la probabilità che nel corso della loro lunga vita le CS accumulino lesioni geniche capaci di portare alla trasformazione neoplastica. Recentemente, su alcuni modelli murini, è stato infatti identificato un nuovo tipo di CS, le cellule staminali pre-neoplastiche (pCSC). Queste rappresentano uno stadio intermedio tra la cellula non-neoplastica e quella tumorale; ed hanno, infatti, caratteristiche sia delle CS che delle cellule staminali tumorali (CSC, Lobo et al., 2008). La scoperta delle pCSC permette quindi di ricostruire l'intero processo di sviluppo neoplastico: CS somatiche accumulano mutazioni che ne inducono la trasformazione conducendo alla formazione di lesioni pre-neoplastiche che in un meccanismo a cascata possono portare alla progressione tumorale con la formazione di una cellula neoplastica ed allo sviluppo di tumori invasivi e metastatici. Questi sono sede delle CSC (dotate di molte caratteristiche in comune con le CS somatiche) capaci di resistere per lungo tempo ai trattamenti terapeutici e di sfuggire ai controlli, anche se (e proprio in virtù del fatto che) rappresentano solo una rara sottopopolazione della massa tumorale. 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 CS e CSC, potrebbero essere passaggi fondamentali per comprendere la formazione e lo sviluppo dei tumori ed identificare così nuovi bersagli molecolari. Inoltre le CSC sono resistenti alle chemio- e radio-terapie convenzionali poiché è stato sperimentalmente dimostrato che una sola CSC è sufficiente a rigenerare il tumore (la CSC è clonogenica), ponendo le basi per la recidiva. Il targeting terapeutico delle CSC è 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 (per una trattazione del rapporto CS - sviluppo tumore si veda in questo volume il contributo di C.A. Redi, "Meccanismi dell'embriogenesi e oncologia molecolare").

Per una piena comprensione della relazione anatomo-funzionale tra i processi di embriogenesi e la formazione-colonizzazione delle CS organo-specifiche è necessario esaminare i processi di biologia dello sviluppo legati all'origine dei tre foglietti embrionali e degli organi che da questi si originano. Per la rilevanza che occupa nel campo della biologia delle CS e nella genesi dei tumori (transizione epitelio-mesenchimale, EMT, e mesenchimale-epiteliale MET) l'origine

e la caratterizzazione del mesoderma (e delle CS mesenchimali) è certamente quella che occupa un posto centrale. Il processo della specificazione molecolare del mesoderma è controllato da un sistema di molecole-segnale extracellulari che mediano la rapida fosforilazione di proteine di trasduzione del segnale a livello citoplasmatico così come la attivazione di fattori di trascrizione che successivamente portano alla attivazione o repressione dei loro corrispondenti geni bersaglio. Questi eventi precoci hanno profonde influenze sul dinamico equilibrio molecolare che mantiene lo stato indifferenziato delle prime cellule embrionali spostandolo, in prima istanza temporale, verso il contesto molecolare capace di specificare la via differenziativa di tipo mesodermale e, in un tempo di sviluppo embrionale successivo, in quello più specifico di restrizione della potenza staminale verso quella di CS organo-specifica. Esempio di questo paradigma di biologia dello sviluppo è quello delle CS mesenchimali non-ematopoietiche nel midollo osseo. Questa presenza fu suggerita per la prima volta, circa 150 anni orsono (nel 1867!) dal patologo tedesco Julius Friedrich Cohnheim il quale ipotizzò che il midollo osseo potesse essere la sede di fibroblasti capaci di contribuire ai processi di cicatrizzazione di diversi tessuti periferici (si veda Prockop, 1997): nei primi anni '70 del secolo scorso i lavori pionieristici del gruppo di Friedenstein dimostrarono che il midollo osseo del topo è sede di una popolazione di cellule fibroblastoidi con potenziale clonogenico in vitro (Friedenstein et al. 1970, Friedenstein, 1980). Ma la domanda su quale fosse l'origine di queste cellule è rimasta inesa sino ad anni recenti quando le conoscenze sulle CS, in particolare sulle staminali embrionali (ES), hanno permesso di delineare un quadro abbastanza soddisfacente. È oggi ben noto che le ES coltivate in vitro formano degli aggregati tridimensionali (i corpi embrionali, Ebs) che ricapitolano gli stadi precoci dello sviluppo embrionale: è stato proprio questo tipo di studi a dare delle indicazioni più precise sul rapporto "embriogenesi e identificazione delle cellule staminali organo-specifiche". Durante la differenziazione delle ES l'espressione del fattore di trascrizione detto T-box (transcription factor Brachyury) segna la comparsa di cellule simili a quelle della stria primitiva, la comparsa delle cellule del mesoderma precoce (Barrero e Belmonte, 2008), così come avviene nello sviluppo embrionale in vivo.

Due popolazioni cellulari positive per la chinasi 1 del fegato fetale (Flk-1 meglio conosciuto come VEGFR2) si possono identificare in due momenti diversi nella popolazione di cellule positive per Brachyury. La più precoce corrisponde agli emangioblasti, una popolazione di cellule che ha sia la capacità ematopoietica sia quella endoteliale e che co-esprime VEGFR2 e Brachyury (Choi et al., 1998). Queste cellule sono quelle che vanno incontro ad un programma differenziativo ematopoietico simile a quello che si manifesta nel sacco del tuorlo (yolk-sac-like hematopoietic program) e generante i progenitori eritroidi primitivi. Dopo un periodo di tempo piuttosto lungo si possono poi identificare cellule che esprimono CD34 (Vodyanik et al., 2005). La seconda popolazione di cellule VEGFR2 positiva che emerge da quelle Brachyury positive consiste di cellule progenitrici capaci di generare cellule cardiache, endoteliali e della muscolatura liscia (Kattman et al., 2006). Le cellule che vanno incontro alla differenziazione come cardiomiociti

esprimono i fattori di specificazione cardiaca appartenenti alla famiglia GATA (GATA-4, 5 e 6) e alla famiglia di Tbx (per una review si veda Menard et al., 2004). Modulatori di questi processi sono i morfogeni che controllano la determinazione del mesoderma (tra questi, i principali sono la superfamiglia β del TGF e la famiglia delle Wnt). Il legame di antagonisti ai recettori di TGF β determina la attivazione di un fenomeno a cascata costituito dall'attivazione di diversi fattori di trascrizione e di geni bersaglio. Questo intricato groviglio di relazioni architetture/funzionali tra tante distinte molecole segnale è reso ancora più complesso dall'esistenza di meccanismi di azione e contro-azione positivi e negativi tra le diverse reti di segnale. Il che rende evidente quanto ancora vi sia da sperimentare per giungere ad una completa dissezione molecolare degli eventi di determinazione del mesoderma, qui assunto a paradigma di quanto si sta facendo per ectoderma ed endoderma.

Cellule staminali nell'ovario: un esempio

Una delle assunzioni di base della biologia della riproduzione afferma che le gonadi femminili dei mammiferi adulti possiedono un numero fisso e non rinnovabile di oociti sin dalla nascita e che, come recentemente affermato (Liu et al., 2007), tutti gli oociti presenti sin dalla nascita sono bloccati allo stadio di diplotene della prima divisione meiotica (la meiosi riprenderà solo una volta avvenuta la fecondazione) e sono circondati da gruppi di cellule somatiche che danno origine a strutture conosciute con il nome di follicoli (Zuckerman, 1951, McLaren, 1984). Questo dato contrasta, come ben noto, con le proprietà delle cellule germinali maschili le quali sono in grado di mantenere la loro capacità proliferativa durante tutta la vita adulta e di rinnovare continuamente il pool di cellule germinali staminali destinate alla formazione di spermatozoi maturi. Va comunque precisato che, per quanto sorprendente possa apparire, molti aspetti basilari della oogenesi sono poco conosciuti: basti pensare che ancora non è del tutto chiarito il processo citodifferenziativo dei "più piccoli" follicoli umani (Westegard et al., 2007). Proprio per questo motivo l'idea della presenza di cellule germinali staminali nell'ovario adulto (Johnson et al., 2004) è degna di ulteriori ricerche.

Nel corso degli ultimi decenni la comunità scientifica, dimostrando l'esistenza di cellule germinali staminali in ovari adulti, ha sviluppato un nuovo paradigma concettuale: la definizione del processo di neo-oogenesi.

Questo fenomeno è stato descritto in passato in numerosi studi pionieristici condotti sui primati (David et al., 1974; Duke, 1967), sul moscerino della frutta (*Drosophila melanogaster*) e su una specie particolare di gamberetto (*Artemia franciscana*): in tutti questi casi, è stato dimostrato che l'oogenesi è un processo continuo (cioè le cellule germinali femminili sono in grado di dividersi ripetutamente), proprio come quello di spermatogenesi (Spradling, 2004; Kirilly e Xie, 2007).

Le prime importanti evidenze di neo-oogenesi nei mammiferi sono frutto del gruppo del prof. Tilly (Johnson et al., 2004) che ha infatti messo in evidenza come le cellule staminali germinali femminili siano in grado di rigenerare la riserva di oociti in ovari adulti.

I dati sino ad ora pubblicati sostengono tuttavia la necessità di altre prove sull'esistenza di cellule germinali proliferanti (FSGCs) che sono alla base della produzione di nuovi oociti (e quindi di strutture follicolari) nell'ovario adulto dei mammiferi.

La dimostrazione dell'esistenza di FSGCs è dunque di fondamentale importanza per lo studio dei meccanismi che sono alla base di una possibile ripresa della oogenesi (e dunque della fertilità) in donne sub-fertili o sterili. Nei Mammiferi (nell'uomo in particolare), il termine dell'attività ovarica coincide, fisiologicamente, con l'inizio della menopausa o, tristemente, come effetto collaterale dovuto all'assunzione di farmaci (oppure dopo chemio o radio terapie) utilizzati nelle terapie antitumorali. Questo fenomeno provoca una serie di mutamenti fisiologici che riguardano gli aspetti clinici (complicazioni come l'osteoporosi, malattie cardiovascolari) e/o psicologici come depressione ricorrente e disfunzioni cognitive. Ci si auspica che terapie basate sulla riacquisizione della oogenesi (neo-oogenesi) possano essere utilizzate, in un futuro prossimo, per lo studio e la cura almeno di alcune delle patologie correlate con la cessazione della processo di oogenesi/follicologenesi.

Bibliografia

1. Arai F, Suda T. Quiescent stem cells in the niche, StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, <http://www.stembook.org>, 2008.
2. Barrero MJ e Belmonte JC. Epigenetic mechanisms controlling mesodermal specification StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook, <http://www.stembook.org>, 2008.
3. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003; 113: 643-655.
4. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*. 1998; 125: 725-732.
5. David GF, Anand Kumar TC, Baker TG. Uptake of tritiated thymidine by primordial germinal cells in the ovaries of the adult slender loris. *J Reprod Fertil*. 1974; 41: 447-451.
6. Duke KL. Ovogenic activity of the fetal type in the ovary of the adult slow loris, *Nycticebus coucang*. *Folia Primatol (Basel)*. 1967; 7: 150-154.
7. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970; 3: 393-403.
8. Friedenstein AJ. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Haematol Blood Transfus*. 1980; 25: 19-29.
9. Kirilly D, Xie T. The Drosophila ovary: an active stem cell community. *Cell Res*. 2007; 17: 271-280.
10. Hsu YC, Fuchs E. A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012; 13: 103-114.

11. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 2004; 428: 145-150.
12. Kattman SJ, Huber TL, Keller GM. Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev Cell*. 2006; 11: 723-732.
13. Liu Y, Wu C, Lyu Q, Yang D, Albertini DF, Keefe DL, Liu L. Germline stem cells and neo oogenesis in the adult human ovary. *Dev Biol*. 2007; 306: 112-120.
14. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007; 23: 675-699.
15. McLaren A. Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp Soc Exp Biol*. 1984; 38: 7-23.
16. Menard C, Grey C, Mery A, Zeineddine D, Aimond F, Puceat M. Cardiac specification of embryonic stem cells. *J Cell Biochem*. 2004; 93: 681-687.
17. Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulson R, Wright NA. The new stem cell biology: something for everyone. *Mol Pathol*. 2003; 56: 86-96.
18. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-74.
19. Rodriguez-Porcel M, Wu JC, Gambhir SS. Molecular imaging of stem cells. *StemBook*, ed. The Stem Cell Research Community, <http://www.stembook.org>, 2009.
20. Spradling AC. Stem cells: more like a man. *Nature*. 2004; 428: 133-134.
21. Takubo K, et al. Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2013; 12: 49-61.
22. Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, Slukvin II. Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood*. 2005; 105: 617-626.
23. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*. 2000; 287: 1427-1430.
24. Westergaard CG, Byskov AG, Andersen CY. Morphometric characteristics of the primordial to primary follicle transition in the human ovary in relation to age. *Human Reprod*. 2007; 22: 2225-2231.
25. Xie T. Germline stem cell niches. *StemBook*, ed. The Stem Cell Research Community, *StemBook*, <http://www.stembook.org>. 2008.
26. Yu WM, Liu X, Shen J, Jovanovic O, Pohl EE, Gerson SL, Finkel T, Broxmeyer HE, Qu CK. Metabolic regulation by the mitochondrial phosphatase PTPMT1 is required for hematopoietic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell*. 2013; 12: 62-74.
27. Zuckerman S. The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Prog Horm Res*. 1951; 6: 63-108.

Le nicchie delle cellule staminali degli organi solidi

Manuela Monti

Centro di Ricerche in Medicina Rigenerativa, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Il concetto ed il termine di “nicchia delle cellule staminali” sono stati formulati da Robert Schofield nel 1978 (Schofield, 1978) sulla base di considerazioni teoriche e dati accumulati a dimostrazione del fatto che nella milza di topi irradiati, le cellule del midollo osseo erano in grado di generare cellule del sangue. Per spiegare questo risultato Schofield suggerì che le cellule staminali ematopoietiche si dovessero associare ad altre cellule per mantenere la loro capacità “di essere staminali” (stemness), altrimenti si sarebbero subito differenziate in cellule del sangue senza ristabilire una completa e duratura funzione ematopoietica agli animali irraggiati.

Come per tutta la storia delle cellule staminali, si deve alla ematologia (ancora una volta!) sia la proposizione di nuovi concetti sia la prova, il dato empirico, a sostegno degli stessi (ancora prima che questi vengano sviluppati): era infatti già noto da tempo, grazie ai risultati della terapia di trapianto di cellule del midollo osseo per il trattamento della leucemia, che il successo di un simile intervento terapeutico era legato alla precedente ablazione (per irraggiamento) delle esistenti cellule staminali ematopoietiche.

La prima nicchia di cellule staminali descritta in termini molecolari è stata quella della linea germinale femminile in *Drosophila melanogaster* (Wieschaus e Szabad, 1979; Lin e Spradling, 1993) con la individuazione delle cellule germinali staminali nella estremità anteriore del gemmario dell’ovario. E così dopo circa vent’anni dalla formulazione della iniziale ipotesi di “nicchia” da parte di Schofield vennero individuate le cellule somatiche che costituiscono la nicchia delle cellule germinali femminili in *Drosophila*: una sorta di cappuccio (cap cells) di cellule somatiche postmitotiche secernenti la proteina DPP (Decapentaplegic Protein, omologa della proteina BMP, Bone Morphogenetic Protein) necessaria per il mantenimento della capacità di rinnovo delle cellule staminali (Xie e Spradling, 1998; Casanueva e Ferguson, 2004). Di grande rilievo per il concetto che oggi abbiamo sviluppato di nicchia delle cellule staminali (per recenti reviews si vedano Scadden, 2006; Hsu e Fuchs, 2012) è il fatto che, se in *Drosophila* le cellule staminali germinali dell’ovario vengono selettivamente distrutte con una ablazione laser, si assiste ad una invasione delle cellule germinali in via

di differenziazione (poste più prossimali alle cellule del cappuccio) nello spazio lasciato vuoto dalle cellule eliminate. Così facendo, prendono contatto con le cellule del cappuccio che determinano la de-differenziazione (con la riacquisizione del fenotipo staminale) delle cellule che stavano precedentemente differenziandosi (Xie e Spradling, 2000).

Contrariamente a quanto inizialmente ipotizzato, nel corso degli ultimi due-tre anni si è constatato che questa prima caratteristica costituzione di nicchia non è comunque di validità generale: infatti è ben diversa da quella che oggi conosciamo, ad esempio, per il bulbo pilifero dei capelli (Hsu et al., 2011) o per l'intestino dei mammiferi (Sato et al., 2011) dove una popolazione residente di cellule differenziate entra nella costituzione della nicchia e non viene de-differenziata. Questa comparazione permette di chiarire che ciascuna nicchia è caratterizzata da specifiche ed uniche proprietà fisio-morfologiche capaci di assicurare a ciascuna linea staminale le condizioni più adatte alla funzione di staminalità. In Biologia, quello della composizione strutturale (isto-architettura) e della costituzione cellulare (cito-tipologia) della nicchia della cellula staminale è certamente uno dei casi più affascinanti di simmorfosi (Weibel et al., 1991). Tradizionalmente, la nicchia delle cellule staminali è stata concepita come un microambiente capace di mantenere la funzione di staminalità (stemness) delle cellule staminali stesse e di promuovere la loro capacità di rinnovo. Con la recentissima individuazione di molte nicchie diversamente organizzate negli organi solidi (vedi oltre) è oggi forse più appropriato descrivere la nicchia come una porzione discreta di tessuto ("locale", "anatomica" parlandone in termini fisici) capace di creare un microambiente che ospita e influenza il comportamento e le caratteristiche delle cellule staminali (Hsu e Fuchs, 2012). In altre parole diviene sempre più chiaro che la nicchia non solo mantiene la funzione di staminalità (stemness) delle cellule staminali e ne promuove il rinnovo ma ne controlla anche diverse funzioni quali:

- il permanere in G0 (l'essere "dormiente", la "dormancy" long lasting cell cycle degli autori anglosassoni);
- la attivazione transiente;
- il mantenimento dello stato indifferenziato;
- la mobilitazione in tempi diversi ed altre caratteristiche ancora.

Tutte queste sono proprietà fisiologiche della nicchia, capaci di preservare la funzione di staminalità durante lo sviluppo ontologico e la senescenza.

Nicchia delle cellule germinali nel testicolo di *Drosophila*

La nicchia delle cellule staminali germinali maschili in *Drosophila* si trova all'estremità apicale del testicolo ed è costituita da diverse tipologie di cellule staminali:

- le cellule staminali germinali (Germ Stem Cells, GSCs),
- le cellule staminali somatiche della cisti testicolare (Cyst Stem Cells, CySCs);
- e di cellule somatiche (equivalente alle cellule del cappuccio, cap cells, presenti nella nicchia delle germinali femminili nell'ovario) ed è costituita da cellule del "nodo" o cellule "hub", Hub cells.

In questo contesto architetturale le GSCs producono i gonioblasti che andranno incontro ad una differenziazione sincrona producendo spermatogoni e quindi spermatozoi. Le CySCs generano cellule somatiche di accompagnamento che avvolgono i gonioblasti e gli spermatogoni in via di maturazione.

L'armonico sviluppo, rinnovo e differenziamento di questi tipi cellulari è orchestrato da una fitta rete di segnali (pathways) che inducono le cellule Hub a produrre la molecola Unpaired (UPD) in grado di attivare la chinasi trasduttore di segnale Janus (JAK) che, a sua volta, attiva la trascrizione (STAT) nelle cellule staminali CySCs adiacenti alle cellule Hub, promuovendone il rinnovo grazie all'azione dei fattori di trascrizione ZFH1 (Zinc Finger Homeodomain 1) e CHINMO (Chronologically Inappropriate Morphogenesis).

Grazie all'attivazione della via JAK-STAT, le cellule GSCs sono in grado di aderire alle cellule Hub tramite giunzioni di tipo "aderens". Inoltre, la proteina Decapentaplegica (DPP) e la Glass Bottom Boat (GBB) vengono secrete sia dalle cellule Hub che dalle CySCs attivando la via di segnale BMP nelle cellule GSCs e reprimendo il fattore di differenziazione *bam* (*bag of marbles*). L'insieme di queste relazioni strutturali e funzionali (di simmorfosi!) permette alle cellule staminali germinali di rinnovarsi indefinitamente.

Nicchia delle cripte intestinali

Le cellule staminali delle cripte intestinali (ISCs, identificabili grazie al fatto che esprimono una proteina di membrana di tipo G chiamata LGR5+, (Leu-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5) si trovano sul fondo delle cripte e generano tutti i progenitori delle linee delle cellule differenziate dell'epitelio intestinale, incluse le cellule della propria nicchia, le cellule di Paneth.

Le cellule di Paneth sono in grado di mantenere la staminalità delle ISCs sia in vivo che in vitro grazie alla produzione di svariate proteine tra cui WNT3, il fattore di crescita dell'epidermide EGF, il transforming growth factor- α (TGF α) ed il ligando Delta-like ligand 4 (DLL4). Se il numero delle cellule di Paneth viene sperimentalmente ridotto (per mutazione o ablazione) si riduce anche il numero delle ISCs che, a loro volta, ricompongono una sorta di nicchia disponendosi a *clusters*, piccoli raggruppamenti. Nella costituzione della nicchia partecipa anche un altro tipo di staminale intestinale a lento ciclo cellulare (rispetto alla velocità delle ISCs) conosciuta come "+4 ISCs" per via della posizione spaziale che occupa nella architettura della nicchia, in posizione "quarta", come quarta cellula rispetto al fondo della cripta occupata da Paneth e ISCs. Queste cellule +4 ISCs a lento ciclo cellulare delimitano un confine tra la porzione bassa della cripta e la porzione colonnare che si rivolge verso l'alto (verso il lume della cripta). Tale porzione luminale è costituita da cellule mesenchimali che essendo un altro componente cellulare della nicchia, costituiscono il comparto transiente di amplificazione delle staminali e producono proteine BMP (BMP2, BMP4) che reprimono l'attività delle cellule +4 ISCs. Oltre a queste cellule mesenchimali si trovano le cellule differenziate che si vanno spostando verso i villi veri e propri. Sono stati identificati diversi geni che vengono espressi dalle cellule +4 ISCs, tra questi quelli che codificano per la su-

bunità BMI1 del complesso Polycomb, la trascrittasi inversa della telomerasi e la proteina HOPX1 (atypical Homeodomain-containing Protein)

Nicchia delle cellule staminali ematopoietiche

La eterogenea costituzione delle nicchie staminali così come sta emergendo in questi ultimi anni trova un chiaro riscontro nella costituzione di quella delle cellule staminali ematopoietiche, HSC. In quest'ultima risulta chiaro il ruolo giocato dalla componente di cellule staminali ormai non più del tutto indifferenziate ma già sulla via della differenziazione, ovvero delle cellule definite "committed" dagli autori anglosassoni. Sono proprio questi inattesi (rispetto alle proposizioni teoriche ed ai primi dati su *Drosophila*) abitanti della nicchia che assicurano una fine regolazione ed integrazione di tutti i segnali di stimolo e blocco, assicurando così una dinamica fisiologia della nicchia e del suo microambiente.

Quella delle HSC si presenta come il prototipo di quello che è oggi il concetto di nicchia: un ricco e complesso ambiente di diversi tipi di cellule e sostanze. La gran parte delle HSCs si trova nel midollo osseo che può essere considerato suddiviso in due nicchie: endosteale e perivascolare. Le HSCs che si trovano nell'endosteale tendono ad essere più lente nella loro progressione del ciclo cellulare mentre quelle che si trovano nella nicchia perivascolare sono ben più attive e presentano un ciclo cellulare più rapido. Le HSCs a ciclo cellulare più lento di tutte sono quelle localizzate vicino ai progenitori degli osteoblasti (preosteoblasti). Due dei tipi cellulari prodotti dalla differenziazione finale delle HSCs, i linfociti T_{reg} (T - regolatori) ed i macrofagi sono tra i più cruciali regolatori del comportamento differenziativo delle cellule HSCs; va comunque precisato che molti altri tipi cellulari sono presenti nelle due nicchie (endosteale e perivascolare) e tutti partecipano alla regolazione del microambiente (con la sola eccezione degli osteoclasti) svolgendo diversi ruoli. Le cellule T_{reg} regolano il microambiente sotto il profilo immunologico e preservano le HSCs da eventuali attacchi immunitari rendendo di fatto la nicchia un ambiente "privilegiato" sotto il profilo immunologico. I macrofagi giocano un ruolo cruciale nel mantenere (restringendo fisicamente, spazialmente) la distribuzione delle HSCs ristretta alla sola nicchia del midollo osseo grazie ad un meccanismo indiretto di interazione con le HSCs. Questo meccanismo si esplica tramite la intermediazione di due tipi cellulari, gli osteoblasti e una piccola frazione di cellule staminali mesenchimali (MSCs) nestina-positive.

Come i macrofagi "dialoghino" con le cellule MSCs nestina-positive nell'interscambio di messaggi non è ancora chiaro. L'ablazione dei macrofagi nestina-positivi determina una drastica riduzione di diversi fattori regolatori della nicchia (prodotti dai macrofagi stessi ed esercitanti un effetto paracrino) quali il ligando CXC della chemochina-12 (CXCL12), l'angiopoietina 1 (ANGPT1), il ligando KIT (KITL) ed il fattore di adesione vascolare (Vascular Cell Adhesion Molecule 1, VCAM1): in questa situazione l'effetto finale è il passaggio di cellule HSCs attraverso le cellule endoteliali dei sinusoidi e la loro entrata in circolo, in altre parole: la mobilitazione delle HSCs dalla nicchia del midollo osseo e il loro passaggio nel circolo sanguigno periferico.

Nicchia delle cellule staminali del follicolo pilifero

La nicchia delle cellule staminali del follicolo pilifero (HFSCs) è forse quella più intricata sotto il profilo anatomico e certamente una delle più dinamiche nelle interazioni tra cellule della nicchia HFSCs (e la loro progenie) e le componenti cellulari del derma. Per meglio orientarsi in questa situazione fisio-anatomica è bene ricordare che il numero di capelli nel capillizio è costante e predeterminato già alla nascita, circa 100.000-150.000, frequentemente raggruppati in ciuffetti di 2-5 germi (raramente anche singolarmente) sulla superficie cutanea. Nel corso dello sviluppo fetale i germi primitivi del pelo si formano a partire da gruppi di cellule basali dell'epidermide che si addensano tra loro e si invaginano nel derma e nell'ipoderma inglobando in questo processo di invaginazione anche cellule mesenchimali del derma; queste ultime daranno origine alla papilla dermica. Il follicolo pilifero è diviso in quattro regioni anatomiche a partire dalla superficie dell'epidermide: infundibulo, istmo, regione soprabulbare (o zona della bulge) e bulbo. A sua volta il capello è composto da 3 parti:

- il fusto (la parte visibile del capello);
- la radice (da cui cresce il fusto);
- il follicolo pilifero (da cui si sviluppa la radice).

La storia del ciclo vitale del capello è di circa 5 anni, suddivisa in 3 fasi:

- 1) fase anagena o di accrescimento (interessa l'80-85% dei capelli), di durata variabile tra i 2-5 anni con un accrescimento medio di 1,5-2 cm al mese;
- 2) fase catagena o di involuzione (interessa circa il 2% dei capelli), di durata variabile tra le 3-4 settimane durante le quali l'accrescimento del capello si arresta;
- 3) fase telogena o di riposo (interessa circa il 15-20% dei capelli), di durata variabile all'incirca di 3 mesi durante la quale si verifica la caduta del capello.

Di fatto ogni giorno vede la perdita di circa 40-60 capelli mentre un equivalente numero entra in fase anagena.

La nicchia delle cellule HFSCs si trova nello strato più esterno della regione soprabulbare (la zona della bulge) ed è costituita da una varietà di cellule. Quelle poste nello strato più interno della zona della bulge, a contatto con la radice del pelo, esprimono cheratina 6 (K6+) e sono la progenie differenziata delle cellule HFSCs; producono inoltre alti livelli di BMP6 e di FGF18 (Fibroblast Growth Factor 18), sostanze queste capaci di indurre quiescenza nelle cellule HFSCs. Queste ultime (le vere e proprie cellule staminali) formano uno strato cellulare che riveste le cellule K6+, ponendole dunque in immediato contatto. Durante la fase di riposo (telogena) le cellule HFSCs sono indotte alla quiescenza anche da BMP2 (prodotto dagli adipociti sottocutanei) e da BMP4 (prodotto dai fibroblasti del derma). Verso la fine della fase telogena (quiescenza, riposo) le cellule della papilla dermale producono fattori capaci di indurre la attivazione delle cellule HFSCs, tra questi vi sono FGF7, FGF10, TGF β 2 ed inibitori delle proteine BMP così che tutti gli effetti inibitori presenti nella nicchia subiscono una controreazione. Inoltre le cellule precursori degli adipociti secernono il PDGF α (Platelet-Derived Growth Factor- α) capace di indurre nella papilla dermica la produzione di fattori di attivazione non ancora del tutto identificati. Anche il macroambiente

dell'intorno della nicchia contribuisce alla fitta relazione di azioni-controreazioni tra stimoli di attivazione e di inibizione contribuendo ad abbassare il livello di BMP e ad innalzare quello dei segnali della via di WNT. Così, quando i segnali di attivazione superano una determinata soglia e prevalgono su quelli di inibizione, le cellule HFSCs che si trovano alla base della zona bulge (chiamate oltreoceano "hair germ cells") iniziano a proliferare determinando la crescita del capello (fase anagena). La papilla dermale viene così spinta lontano dalla zona di bulge e le cellule HFSCs entrano in uno stato di quiescenza. Durante la fase catagena di involuzione due popolazioni di cellule poste al di fuori della radice del capello (ORS, Outer Root Sheath), vengono a costituire la riserva di cellule (un nuovo bulge) del futuro ciclo telogeno: il gruppo di cellule addossate al vecchio bulge e ciclanti più lentamente formano il nuovo strato esterno del nuovo bulge mentre il gruppo di cellule ORS poste vicine alla matrice del pelo e ciclanti più velocemente, divengono le nuove cellule K6+ dello strato interno del bulge. Così facendo la storia del ciclo vitale del capello riprende.

Bibliografia

1. Casanueva MO, Ferguson EL. Germline stem cell number in the *Drosophila* ovary is regulated by redundant mechanisms that control Dpp signaling. *Development*. 2004; 131: 1881-1890.
2. Hsu YC, Pasolli HA, Fuchs E. Dynamics between stem cells, niche, and progeny in the hair follicle. *Cell*. 2011; 144: 92-105.
3. Hsu YC, Fuchs E. A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012; 13: 103-114.
4. Lin H, Spradling AC. Germline stem cell division and egg chamber development in transplanted *Drosophila* germaria. *Dev Biol*. 1993; 159: 140-152.
5. Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, Barker N, Shroyer NF, van de Wetering M, Clevers H. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*. 2011; 469: 415-418.
6. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006; 441: 1075-1079.
7. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978; 4: 7-25.
8. Xie T, Spradling AC. decapentaplegic is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Cell*. 1998; 94: 251-260.
9. Xie T, Spradling AC. A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science*. 2000; 290: 328-330.
10. Weibel ER, Taylor CR, Hoppeler H. The concept of symmorphosis: A testable hypothesis of structure-function relationship. *PNAS*. 1991; 88: 10357-10361.
11. Wieschaus E, Szabad J. The development and function of the female germ line in *Drosophila melanogaster*: a cell lineage study. *Dev Biol*. 1979; 68: 29-46.
12. Mondal BC, et al. Interaction between differentiating cell- and niche-derived signals in hematopoietic progenitor maintenance. *Cell* 2011; 147: 1589-1600.

Growth factors and tumour progression

Ermanno Gherardi, Luisa Iamele, Hugo de Jonge

Division of Immunology and General Pathology, Department of Molecular Medicine,
University of Pavia

Clinically-relevant tumours evolve over time from one or few transformed cells to complex cell societies displaying variable degrees of mitotic activity, differentiation potential and ability to spread to adjacent tissues and at distant sites (metastasis). Tumour progression reflects both the initial genetic and epigenetic changes that enacted cell transformation and an array of interactions between the tumour cells and the surrounding tissues, namely resident stromal cells - including and blood and lymphatic vessels, inflammatory and immune cells. Polypeptide growth factors and their receptors mediate many of these interactions and provide essential cues for:

- maintaining the self-replicative potential of cancer-stem cells in their specialised tissue microdomains (niches);
 - driving clonal expansion and differentiation of bulk tumour cell population;
 - engaging the endothelial cells of surrounding tissue and promoting tumour angiogenesis;
 - driving the process of tissue invasion, the first step in the metastatic cascade.
- In certain instances responding tumour cells are the source of the signals but more often growth factor - receptor signalling reflects complex and reciprocal interactions between the developing tumour and the surrounding tissue that need to be understood in order to identify rational targets for cancer therapy.

Growth factors and cancer stem cells

Genetic heterogeneity of human tumours has been consistently reported over a number of years using chromosomal karyotyping and a variety of molecular genetic techniques, ie fluorescence in situ hybridisation, loss of heterozygosity and microsatellite shift, on micro-dissected tissues and/or selected cell populations (reviewed in¹). It has also been confirmed by the results of several recent cancer genome sequencing projects where certain mutations only emerge in selected reads, thus implying clonal complexity and clonal segregation of mutations²⁻⁷.

Cellular heterogeneity of human tumours has been known to pathologists since R Virchow's description of tumour cells⁸ but the quest for the origin of tumour cells is far more recent. A low clonogenic and tumorigenic potential of cells isolated from leukaemias and solid tumours was reported in several studies conducted

through the 1960s and 70s⁹ and the concept of cancer stem cells was set in stone by Anne W Hamburger and Sydney Salmon in a classic 1977 paper that opened with a set of statements that could be lifted, verbatim, from several of the most recent articles: *'Tumor stem cells are the cell renewal source of a neoplasm and also serve as the seeds of metastatic spread of cancer. Studies of transplantable tumours in animals indicate that tumor stem cell colony-forming assays (in vivo or in vitro) can be used to study the biological properties of these cells and to delineate differences in individual sensitivity to a variety of chemotherapeutic agents'*¹⁰. Seventeen years after the Hamburger & Salmon paper, John Dick et al. brought cancer stem cells back to the front line by reporting that human acute myeloid leukaemia contained a rare subpopulation of cells that could engraft growth-factor treated SCID mice and proposed a hierarchical model of tumour progression reflecting the one underlying the development of normal tissues¹¹. Similar findings were reported by other investigators for other leukaemias and, in subsequent years, for several types of solid tumours (reviewed in¹²).

The cancer stem cell paradigm has proved to be a fruitful working hypothesis with implications for cancer therapy but research carried out over the last decade has highlighted that the hierarchical model may apply to some - perhaps several - human tumours but cannot be held as a universal model of tumour progression. Specifically:

- development of mouse lines in which the immune system was further compromised (the so-called NOD/SCID/IL2R γ mouse) demonstrated that the number of CSC present in certain tumours is very much dependent on the xenogeneic assay system (see for example¹³);
- analysis of the clonal architecture of the cells of human acute lymphoblastic leukaemias has demonstrated a complex pattern of genetic intraclonal variation within the population of leukaemia propagating cells, at variance with the hierarchical model¹⁴;
- the first wave of mouse lineage-tracing experiments have confirmed that benign tumours of the skin and intestinal epithelium develop according to a hierarchical paradigm similar to the one that governs the turnover of the normal tissue counterpart^{15, 16} but analysis of skin carcinomas by the same method highlighted a different cellular architecture defined by a dominant clonal phenotype that does not fit a hierarchical model of tumour progression¹⁵;
- there is strong evidence from lineage tracing experiments in mice that several tumours develop from clonal expansion of horizontal, differentiated cells and not from stem or progenitor cells. These include a metastatic retinoblastoma in pRB^{-/-}, p107^{+/-}, p130^{-/-} mice¹⁷ and several other examples.

The vast body of data accrued over the last few years allows us to interpret tumour progression within the framework of a classical Darwinian process of microevolution dominated by variation (*via* mutation) and selection (*via* the microenvironment) following the early insights contained in Peter Nowell classic paper in the mid seventies¹⁸ and expanded in recent years by several cancer researchers (see for example¹⁹). In the early stages of tumour development, however, CSC (defined here as self-renewing, tumourigenic cells) are found in niches and several

signalling systems, notably the ones involved in the specification of stemness, fate and lineage of the cells of normal tissues, ie the Wnt, Notch and Hedgehog pathways, have emerged as major drivers of CSC stemness. The Wnt pathway has a pivotal role in several cancers²⁰ and operates in concert with the HGF/SF-MET pathway to promote self-renewal of CSC²¹. The Hedgehog pathway controls stemness of leukaemic cells²² and the Notch pathway controls also control self-renewal and growth of leukaemias and solid tumours in addition to further roles in tumour angiogenesis²³. The VEGF-VEGFR pathway is also involved in CSC stemness²⁴.

Growth factors and tumour angiogenesis

Beside the cancer stem cell field, no other area of tumour cell biology in the last two decades has attracted more endeavour than the study of tumour angiogenesis. Hailed as the ultimate target for tumour therapy²⁵, the molecules responsible for tumour angiogenesis have been dissected and both monoclonal antibodies and small molecule inhibitors of the kinase domain of VEGF receptor (VEGFR) 1 and 2 have been developed and introduced in the clinic for several tumour types. The limited therapeutic activity of these agents²⁶ has prompted new investigations on the mechanisms that enable tumour cells to escape from inhibition of angiogenesis and have uncovered important roles for the transcriptional programmes and signalling pathways elicited by tumour hypoxia and promoting invasion and metastasis²⁷. It may be surmised, therefore, that tumour angiogenesis may evolve from the single target advocated earlier to a component target for combination therapy and a number of preclinical and clinical studies are exploring this concept (see below).

Growth factors and tumour invasion

The earlier studies on the role of growth factors in tumour progression focused on tumour growth, ie the ability of these molecules to increase the number of tumour cells. Deregulated control of cell division is a defining feature of tumour growth but the reduced requirement of cancer cells for exogenous growth signals apparent from the early studies with RSV or SV40 transformation and the mitotic index alone are not key factors separating clinically benign *vs* malignant tumours. The key factor in tumour progression is the emergence of invasiveness and the understanding of the mechanism that control migration of normal animal cells and the abnormal migration of cancer cells, ie the loss of contact inhibition described by M Abercrombie²⁸, is key for the control of metastatic cancer.

The ability of certain groups of animal cells, for example the neural crest cells and the myogenic precursor cells, to migrate at a distance is fundamental for the development of major organ and tissues during embryogenesis but these cells are epithelial derivatives (they derive from the neural tube or the ventral somite) and must first undergo a process of delamination in which they separate from neighbour epithelia and acquire a migratory phenotype. This process of *epithelial-mesenchymal transition* (EMT) is essential for the development of the vertebrate

embryo and also occurs during tumour progression leading to the emergence of migratory cells from a primary epithelial tumour. Several growth factor - receptor pathways, including EGF, FGF and TGF- β , have been involved in the EMT of epithelial tumours²⁹ but the signalling system that exerts the most crucial role in this process is the HGF/SF-MET one^{30, 31}.

HGF/SF was discovered as a potent growth factor for liver cells (HGF) and a fibroblast-derived factor able to induce and control the migration of epithelial cells (SF). HGF/SF signals through the receptor tyrosine kinase encoded by the MET protooncogene and the HGF/SF-MET signalling system is essential for vertebrate development and for the regeneration of several epithelial organs in postnatal life but plays a further and fundamental role in tumour progression. Both HGF/SF and MET are complex multidomain proteins whose three-dimensional structures have been recently defined enabling the development of protein antagonists and small molecule inhibitors of the MET kinase for cancer therapy. It is widely expected that inhibitors of HGF/SF-MET signalling will hold a major role in the therapy of human cancer in years to come. Two further developments in this area deserve mention. The first is that the MET gene is one of the transcriptional targets of HIF- α . Thus, under the hypoxic conditions that frequently occur during tumour growth, MET is overexpressed and leads to HGF/SF-MET mediated tumour invasion²⁷. The second is that MET mediates escape from therapy with EGFR inhibitor (EGFR) inhibitors of tumours initially dependent on the EGF/EGFR receptor pathway, such as NSCLC³². These results offer further highlight MET as a key target for cancer therapy and offer a strong rationale for combined therapies with MET/VEGFR or MET/EGFR inhibitors.

Abbreviations: ALL: acute lymphoblastic leukaemia; AML: acute myeloid leukaemia; CSC: cancer stem cells; EMT: epithelial-mesenchymal transition; EGF: epidermal growth factor; FGF: fibroblast growth factor; HGF/SF: hepatocyte growth factor/scatter factor; HIF- α : Hypoxia-induced factor- α ; NSCLC: non small cell lung carcinoma; RSV: Rous sarcoma virus; SV40: simian virus 40; SCID: severe combined immuno deficiency; TGF- β : transforming growth factor- β ; VEGF: vascular endothelial growth factor.

References

1. Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1805: 105-117.
2. Banerji S, et al. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature* 2012; 486: 405-409.
3. Berger MF, et al. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature* 2012; 485: 502-506.
4. Biankin AV, et al. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* 2012; 491: 399-405.
5. Plesance ED, et al. A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure. *Nature* 2010; 463: 184-190.

6. Pugh TJ, et al. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet* 2013; 45: 279-284.
7. Schmitz R, et al. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 2012; 490: 116-120.
8. Virchow R. *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre.*, (Verlag von August Hirschwald., 1859).
9. Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 311-321.
10. Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 1997; 197: 461-463.
11. Lapidot T, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367: 645-648.
12. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 755-768.
13. Quintana E, et al. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 2008; 456: 593-598.
14. Anderson K, et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* 2011; 469: 356-361.
15. Driessens G, Beck B, Caauwe A, Simons BD, Blanpain C. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. *Nature* 2012; 488: 527-530.
16. Schepers AG, et al. Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science* 2012; 337: 730-735.
17. Ajioka I, et al. Differentiated horizontal interneurons clonally expand to form metastatic retinoblastoma in mice. *Cell* 2007; 131: 378-390.
18. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23-28.
19. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012; 481: 306-313.
20. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005; 434: 843-850.
21. Vermeulen L, et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 468-476.
22. Zhao C, et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* 2009; 458: 776-779.
23. Wu Y, et al. Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature* 2010; 464: 1052-1057.
24. Beck B, et al. A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. *Nature* 2011; 478: 399-403.
25. Folkman J. Angiogenesis. *Annual review of medicine* 2006; 57: 1-18.
26. Rapisarda A, Melillo G. Overcoming disappointing results with antiangiogenic therapy by targeting hypoxia. *Nature reviews. Clinical oncology* 2012; 9: 378-390.
27. Pennacchietti S, et al. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 2003; 3: 347-361,
28. Abercrombie M. Contact inhibition and malignancy. *Nature* 1997; 281: 259-262.

29. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139: 871-890.
30. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 915-925.
31. Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, Woude GV. Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 89-103.
32. Engelman JA, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007; 316: 1039-1043.

FATTORI MICROAMBIENTALI DI PROGRESSIONE TUMORALE

Angiogenesis and antiangiogenesis in multiple myeloma

Angelo Vacca¹, Domenico Ribatti²

¹Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Sezione di Medicina Interna e Oncologia Clinica, Università di Bari

²Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso, Università di Bari

Angiogenesis in multiple myeloma

In 1994, Vacca and colleagues demonstrated for the first time that bone marrow microvascular density was significantly increased in multiple myeloma (MM) compared to monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), and in active versus nonactive MM. The authors first hypothesized that progression from MGUS parallels an increase in bone marrow microvascular density. Several studies show overexpression and secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) by the clonal plasma cells. Plasma cell-derived VEGF also stimulates interleukin-6 (IL-6) and VEGF secretion in bone marrow stromal cells (BMSCs), whereas BMSCs-derived IL-6 promotes proliferation, survival and VEGF production in plasma cells⁸. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2), hepatocyte growth factor (HGF) and its receptors c-Met, angiopoietin-1 (Ang-1), insulin like growth factor-1 (IGF-1), matrix metalloproteinase-2 and -9 (MMP-2 and MMP-9) are also secreted by MM cells (Vacca et al., 1999; Vacca and Ribatti, 2006).

The MM microenvironment is formed by clonal plasma cells, extracellular matrix proteins, and BMSCs, which are intimately involved in all biological stages of intramedullary growth. Reciprocal positive and negative interactions between plasma cells and BMSCs are mediated by an array of cytokines, receptors, and adhesion molecules (Ribatti et al., 2006). Interactions between these components give proliferation, migration and survival of plasma cells, as well as their drug resistance. Plasma cells secrete into their microenvironment several cytokines, such as TNF- α , TGF- β , VEGF, FGF-2, HGF, Ang-1 and MMPs (Vacca and Ribatti, 2006).

Vacca et al. (2003) demonstrated that the endothelial cells of MM bone marrow (MMECs) are characterized by an enhanced expression of specific angiogenic factors/receptors such as VEGF/VEGFR-2, FGF-2/FGF-2R-2, Ang-2/Tie-2, and by an increased *in vitro* and *in vivo* angiogenic activity. These endothelial cells express more mRNA and secrete larger amounts of the CXC-chemokines CXCL8/IL-8, CXCL11/interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant (I-TAC), CXCL12/SDF-1 α and CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)

than human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Since paired plasma cells express cognate receptors to a variable extent, paracrine loops between MMECs and plasma cells involving CXC-chemokines and their receptors may be operative in patients and mediate plasma cell proliferation and homing.

We have demonstrated that pp60c-Src is a key signaling effector of VEGF loop required for MMECs survival, migration and angiogenesis, and assessed the antiangiogenic activity of dasatinib, a novel orally bioactive PDGFR β /Src TK-inhibitor that significantly delayed MM angiogenesis *in vivo* (Coluccia et al., 2008).

We have carried out a comparative gene expression profiling of MMECs *vs.* MGUS endothelial cells (MGECS) with an Affymetrix assay (Ria et al., 2009). Twenty-two genes were found differentially expressed (14 down-regulated and 8 up-regulated) in MMECs *vs.* MGECS. Deregulated genes were mostly involved in extracellular matrix formation and bone remodeling, cell adhesion, chemotaxis, angiogenesis, resistance to apoptosis, and cell-cycle regulation. Validation was focused on *DIRAS3*, *SERPINF1*, *SRPX*, *BNIP3*, *IER3*, and *SEPWI* genes, which were not previously found to be functionally correlated to the overangiogenic phenotype of MMECs. Small interfering RNA for the up-regulated genes *BNIP3*, *IER3*, and *SEPWI* affected critical endothelial cell functions mediating this overangiogenic phenotype, e.g. proliferation, apoptosis, adhesion, and capillary tube formation.

We have demonstrated that in patients with active MM, plasma cells and stromal cells in the microenvironment recruit hematopoietic stem precursor cells (HSPCs), and induce their differentiation into mature MMECs (Ria et al., 2008). In fact, when incubated with VEGF, FGF-2 and IGF, HSPCs differentiate into endothelial-like cells expressing typical endothelial markers, such as FVIII-RA, VEGFR-2 and VE-cadherin, and form capillary-like networks *in vitro*. Bone marrow MM but not MGUS biopsies revealed HPSCs inside the neovessel wall, suggesting that in the former HSPCs contribute to the neovessel building together with MMECs. Therefore, besides angiogenesis, HSPC-linked vasculogenesis contributes to neovascularization in MM patients.

Antiangiogenesis in MM

The antiangiogenic properties of thalidomide supported its use in MM. Furthermore, in addition to its antiangiogenic activity, thalidomide enhances T-cell- and NK-cell-mediated immunological responses, induces caspase-8-mediated apoptosis, and downregulates IL-6 production within the microenvironment. We analyzed the antiangiogenic properties of thalidomide, and demonstrated that therapeutic doses of thalidomide markedly downregulate dose-dependently key angiogenic genes in MMECs, but upregulate them or are ineffective in endothelial cells of patients with nonactive MM or MGUS. Secretion of VEGF, FGF-2 and HGF also diminished dose-dependently in conditioned media of active MMECs, whereas it did not change in the other conditioned media (Vacca et al., 2005).

Lenalidomide is a 4-amino-glutarimide analogue of thalidomide with antiangiogenic properties. It inhibits the interactions between cadherin 5, beta-catenin, CD31 and adherens junctions which are critical events for angiogenesis to de-

velop. Furthermore, lenalidomide inhibits VEGF-induced PI3K-Akt pathway signalling and HIF-1 α expression, exerts an anti-TNF- α activity, modulates the immune response by T cells and NK cells, induces apoptosis of tumor cells, and decreases the binding of MM cells to bone marrow stromal cells. We have demonstrated that lenalidomide, at clinically achievable concentration, is antiangiogenic *in vivo* and inhibits MMECs migration (De Luisi et al., 2011). Lenalidomide halts the MMECs overangiogenic potential by downregulating key angiogenic genes and VEGF/VEGFR-2-mediated downstream signaling pathways involved in cell motility, and NF- κ B. A comparative proteomic analysis reveals that lenalidomide-treated MMECs modulate the expression levels of angiogenesis-related genes controlling cell motility and invasiveness, cell shape and cytoskeletal dynamic remodeling, as well as energy metabolism pathways and protein clearance.

Bortezomib is a proteasome inhibitor, which induces endothelial cell apoptosis, inhibits VEGF, IL-6, Ang-1 and Ang-2 and IGF-1 secretion in BMSCs and endothelial cells from MM patients, HIF-1 α activity, downregulates caveolin-1 tyrosine phosphorylation, which is required for VEGF-mediated MM cell migration, and also blocks the caveolin-1 phosphorylation induced by VEGF in endothelial cells, thereby inhibiting ERK-dependent cell proliferation. Roccaro et al. (2006) demonstrated that bortezomib inhibits the proliferation of MMECs in a dose- and time-dependent manner. Moreover, in endothelial cell functional assays, including chemotaxis, adhesion to fibronectin, capillary formation on Matrigel, and CAM assay, bortezomib demonstrated a dose-dependent inhibition of angiogenesis.

Zoledronic acid is a bisphosphonate used for MM bone disease and hypercalcemia, that has a direct cytotoxic activity on tumor cells and suppresses angiogenesis. We have demonstrated that therapeutic doses of zoledronic acid markedly inhibit *in vitro* proliferation, chemotaxis and angiogenesis of MMECs, and *in vivo* angiogenesis in the CAM (Scavelli et al., 2007). These effects are partly sustained by gene and protein inhibition of VEGF and VEGFR-2 in an autocrine loop. Mevastatin, a specific inhibitor of the mevalonate pathway, which prevents prenylation of several proteins leading to cellular apoptosis, antiangiogenesis and activation of γ/δ T-cells, reverts the zoledronic acid antiangiogenic effect, indicating that the drug halts this pathway. Angiogenesis is intimately involved in the pathobiology of MM in both preclinical and clinical models. An improved understanding of the importance of angiogenesis-related signaling in MM has allowed for the rational use of antiangiogenic therapies in patients with this malignancy.

The median survival for patients with MM has almost doubled since the introduction of thalidomide, lenalidomide and bortezomib. These agents have been incorporated into conventional cytotoxic and transplantation regimens and used as a treatment for newly-diagnosed MM. Nevertheless, most patients still relapse after an initial response to treatment and multidrug resistance often emerges over time. Considering the complex angiogenesis regulatory network that involves multiple angiogenic factors produced by various cell types, any antiangiogenesis therapy aimed at a single angiogenic factor is not likely to be highly effective. Areas of future investigation include identifying factor other than VEGF that are critical in the angiogenic cascade, elucidating mechanisms of therapeutic resistance, and develop-

ing markers for identifying patients most likely to benefit from antiangiogenic treatment. Novel agents as well as various emerging compounds targeting cell surface receptors, inhibiting signaling pathways or unfolded protein response, interfering with the cell cycle, as well as epigenetic agents are currently under investigation.

References

1. Coluccia AM, Cirulli T, Neri P, Mangieri D, Colanardi MC, Gnoni A, et al. Validation of PDGFRbeta and c-Src tyrosine kinases as tumor/vessel targets in patients with multiple myeloma: preclinical efficacy of the novel, orally available inhibitor dasatinib. *Blood*. 2008; 112: 1346-1356.
2. De Luisi A, Ferrucci A, Coluccia AM, Ria R, Moschetta M, de Luca E, et al. Lenalidomide restrains motility and overangiogenic potential of bone marrow endothelial cells in patients with active multiple myeloma. *Clin. Cancer Res*. 2011; 17: 1935-1946.
3. Ria R, Piccoli C, Cirulli T, Falzetti F, Mangialardi G, Guidolin D, et al. Endothelial differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells from patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 1678-1685.
4. Ria R, Todoerti K, Berardi S, Coluccia AM, De Luisi A, Mattioli M, et al. Gene expression profiling of bone marrow endothelial cells in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2009; 15: 5369-5378.
5. Ribatti D, Nico B, Vacca A. Importance of the bone marrow microenvironment in inducing the angiogenic response in multiple myeloma. *Oncogene*. 2006; 25: 4257-4266.
6. Roccaro AM, Hideshima T, Raje N, Kumar S, Ishitsuka K, Yasui H, et al. Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer Res*. 2006; 66: 184-191.
7. Scavelli C, Di Pietro G, Cirulli T, Coluccia M, Boccarelli A, Giannini T, et al. Zoledronic acid affects over-angiogenic phenotype of endothelial cells in patients with multiple myeloma. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6: 3256-3262.
8. Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Ranieri G, Serio G, Silvestris F, et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1994; 87: 503-508.
9. Vacca A, Ribatti D, Presta M, Minischetti M, Iurlaro M, Ria R, et al. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood*. 1999; 93: 3064-3073.
10. Vacca A, Ria R, Semeraro F, Merchionne F, Coluccia M, Boccarelli A, et al. Endothelial cells in the bone marrow of patients with multiple myeloma. *Blood*. 2003; 102: 3340-3348.
11. Vacca A, Scavelli C, Montefusco V, Di Pietro G, Neri A, Mattioli M, et al. Thalidomide downregulates angiogenic genes in bone marrow endothelial cells of patients with active multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 5334-5346.
12. Vacca A, Ribatti D. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia*. 2006; 20: 193-199.

L'attivazione della coagulazione è un fattore critico di progressione tumorale?

Anna Falanga

U.S.C. Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Dipartimento di Oncologia-Ematologia, A.O. Papa Giovanni XXIII, Bergamo

La relazione fra cancro e trombosi è nota sin dal 1865 quando un medico francese Armand Trousseau descrisse per la prima volta l'associazione tra la diagnosi di trombosi e la presenza di un cancro occulto¹. Le osservazioni di Trousseau e gli studi di laboratorio hanno trovato successivamente numerose e solide conferme nei risultati degli studi epidemiologici. I pazienti neoplastici possono presentare vari disordini dell'emostasi, dall'emorragia alla trombosi, alla coagulazione intravascolare disseminata (CID). Tuttavia le trombosi manifeste o la CID rappresentano solo la punta dell'iceberg di una alterazione sistemica del sistema emocoagulativo. Molto più frequentemente, infatti, si riscontrano in questi pazienti anomalie di laboratorio dell'emostasi, in assenza di manifestazioni cliniche. In particolare, i risultati di alcuni test di laboratorio, che rilevano alterazioni minime dell'equilibrio emostatico, dimostrano che vi è uno stato di ipercoagulabilità subclinico che accompagna lo sviluppo di una neoplasia. Questi test misurano prodotti che si liberano in circolo durante le reazioni della cascata coagulativa, come il frammento 1+2 (F1+2) della protrombina, il fibrinopeptide-A (FPA), il D-dimero, i complessi trombina-antitrombina (TAT), i complessi plasmina-antiplasmina (PAP). Tali prodotti tendono ad essere variamente elevati nei pazienti oncologici¹ e rappresentano dei marcatori *in vivo* della trombino-generazione, fibrino-formazione e fibrinolisi. Inoltre, i risultati di altri test di laboratorio che possono misurare i livelli di marcatori di attivazione cellulare, mostrano che le cellule del sangue, come piastrine, leucociti e cellule endoteliali, circolano in uno stato di attivazione in corso di neoplasie. In questo contesto, il rilievo di microparticelle circolanti (MP), rilasciate dalle suddette cellule o dalle cellule tumorali, appare oggi di particolare interesse, non solo per il possibile ruolo di questi elementi nel determinare lo stato di ipercoagulabilità associato al tumore, ma anche per il coinvolgimento che tali MP, ricche di fattori protrombotici e proangiogenici, possono avere nella crescita e disseminazione tumorale². Nell'insieme, le alterazioni subcliniche del sistema emostatico caratterizzano uno stato di ipercoagulabilità di questi pazienti, che predispone alla trombosi. Tale stato peggiora con la chemioterapia³ e con la progressione della malattia¹.

Meccanismi patogenetici

La patogenesi dell'attivazione della coagulazione del sangue nei pazienti con tumore è complessa e multifattoriale e comprende fattori di rischio trombotico clinici e fattori biologici. I fattori di rischio clinici sono di tipo generale (es. l'età, l'immobilità, la pregressa storia di trombosi, l'obesità, ecc.), e di tipo specifico, cioè legati alla malattia neoplastica (es. il tipo e lo stadio del tumore, le chemioterapie, l'uso di fattori di crescita emopoietici, la presenza di cateteri venosi centrali, ecc.). I fattori di rischio biologici, invece, sono determinati dalle proprietà tipiche delle cellule tumorali, che sono in grado di attivare il sistema emostatico⁴.

Nell'ultimo decennio, gli studi molecolari in modelli sperimentali di tumori umani (i.e. tumore al fegato, cerebrale e gastrointestinale) dimostrano in maniera sempre più convincente che gli oncogeni o geni soppressori (i.e. MET, PTEN, K-ras e p53) guidano l'espressione, da parte delle cellule tumorali, di proteine della coagulazione come parte integrante della trasformazione neoplastica⁵. Inoltre una mutazione del gene EGFR rende le cellule tumorali ipersensibili all'azione del *tissue factor* (TF) e di altri fattori della coagulazione, e questo genera la formazione di un microambiente che promuove la crescita tumorale⁶. Questi dati supportano il concetto di uno scenario complesso in cui eventi oncogenici portano all'acquisizione delle cellule tumorali di un fenotipo procoagulante.

Studi condotti in diversi tipi di tumore dimostrano che le cellule maligne sono in grado di attivare il sistema emostatico in diversi modi. I principali meccanismi comprendono l'espressione di:

- proteine procoagulanti, come il TF ed *cancer procoagulant* (CP);
- MP;
- citochine infiammatorie;
- molecole di adesione⁴.

Gli stessi meccanismi possono contribuire allo sviluppo e alla progressione tumorale (Figura 1).

Il TF, una glicoproteina transmembrana, oltre ad essere il principale attivatore della coagulazione del sangue in condizioni fisiologiche, è il fattore procoagulante tumorale meglio caratterizzato. Esso forma un complesso con il fattore VIIa (TF/FVIIa), che attiva la coagulazione mediante la proteolisi dei fattori IX (FIX) e X (FX). Il TF è costitutivamente espresso dalle cellule tumorali, sia di tumori solidi che ematologici. L'attività del TF nelle cellule tumorali può essere potenziata dall'espressione di fosfolipidi anionici sulla superficie esterna della membrana cellulare⁷ e dalla secrezione di eparanasi. La principale funzione dell'eparanasi è di degradare l'eparansolfato della matrice extracellulare, promuovendo l'invasione e la disseminazione tumorale. Tuttavia, l'eparanasi può anche interagire con l'inibitore fisiologico del TF (TFPI), determinando la dissociazione del TFPI dalle membrane endoteliali e tumorali e, di conseguenza, aumentando dell'attività del TF sulle superfici cellulari⁸. Un altro fattore procoagulante tumorale è il CP, una proteasi cisteinica che attiva direttamente il FX in assenza del FVII. Questa molecola è espressa dalle cellule tumorali e la sua attività è stata rilevata in campioni derivanti da diversi tipi di tumore⁹. Di particolare interesse, il fatto che il CP ri-

localizzato. Inoltre, studi in modelli animali confermano l'ipotesi che le MP contribuiscono alla trombosi associata al tumore. In un modello murino, l'iniezione endovenosa di MP derivanti da cellule tumorali umane induceva l'attivazione della coagulazione e determinava l'insorgenza di una sindrome simile alla CID¹⁴. Le cellule tumorali possono interagire anche con il sistema fibrinolitico, che è coinvolto nei meccanismi di distacco della cellula tumorale dai siti di origine, nei processi di neoangiogenesi e di mobilità e motilità cellulare. In particolare, la cellula tumorale è in grado di esprimere: gli attivatori del plasminogeno (l'urochinasi u-PA e l'attivatore tissutale t-PA), gli inibitori fisiologici (PAI-1 e PAI-2), i recettori come uPAR¹⁵ e annessina II. In pazienti con LAP, l'aumentata espressione di annessina II è stata correlata ad un'eccessiva attivazione della fibrinolisi¹⁶. Verosimilmente, a seconda del tipo di aspetto che prevale, pro- o anti-fibrinolitico, le manifestazioni cliniche possono essere diverse e variare dai sintomi emorragici, come osservato nella leucemia, al tromboembolismo venoso (TEV), come osservato nei tumori solidi.

Infine, le cellule tumorali possono rilasciare una serie di fattori pro-infiammatori, quali TNF- α , IL-1 β , e citochine proangiogeniche, come VEGF e bFGF⁴, che sono in grado sollecitare le attività pro-trombotiche di piastrine, leucociti e altre cellule vascolari. In particolare, nelle cellule endoteliali, queste molecole inducono l'espressione di TF, stimolano la produzione di PAI-1, inibiscono la trombomodulina, ed aumentano l'espressione di molecole di adesione sulla superficie cellulare. La capacità delle cellule tumorali di aderire all'endotelio vascolare costituisce un evento essenziale per promuovere l'attivazione della coagulazione localizzata sulla parete dei vasi ed iniziare la formazione di trombi.

Le proteine della coagulazione e la progressione tumorale

L'attivazione della coagulazione del sangue può influire in diversi modi sulla crescita tumorale e sulla formazione di metastasi. Le proteine procoagulanti come il TF, il Fattore VIIa, il Fattore Xa, la trombina e la fibrina sono tutte in grado di promuovere il processo neoplastico favorendo la neoangiogenesi e la formazione di metastasi. La fibrina favorisce la progressione tumorale attraverso vari meccanismi, ad es: fornisce la rete di supporto per la formazione di nuovi vasi, induce l'espressione di TF e di IL-8 da parte delle cellule endoteliali, protegge i fattori di crescita proangiogenici (bFGF, VEGF ed il fattore di crescita insulino-simile) dalla degradazione proteolitica. Infine, i depositi di fibrina sulle cellule tumorali favoriscono il processo metastatico stabilizzando l'adesione all'endotelio delle cellule tumorali e dei microtrombi contenenti cellule tumorali.

La trombina ed il TF partecipano alla progressione tumorale anche mediante meccanismi indipendenti dalla coagulazione, ossia tramite i recettori attivati dalle proteasi (PAR), espressi sulla superficie di piastrine, cellule tumorali, cellule muscolari lisce dei vasi, e macrofagi. L'attivazione dei PAR da parte della trombina stimola l'espressione ed il rilascio di fattori di crescita e di chimochine, che promuovono la proliferazione e la migrazione delle cellule tumorali¹⁷. Inoltre, il complesso TF/Fattore VIIa coopera con il TFPI dei vasi intra-tumorali nel determinare l'adesione e la

migrazione cellulare, con meccanismi indipendenti dalla generazione di trombina⁴. Le piastrine attivate ed i leucociti anche contribuiscono alla progressione tumorale. In particolare, le piastrine attivate facilitano l'adesione delle cellule tumorali all'endotelio, promuovendone la migrazione attraverso la parete dei vasi (attraverso il rilascio di eparanasi). Inoltre, le piastrine adese alle cellule tumorali supportano la formazione delle metastasi proteggendo le cellule tumorali dall'attacco delle cellule del sistema immunitario¹⁸. Indipendentemente dalla trombina, le piastrine possono essere attivate dai fattori pro-aggreganti rilasciati dalle cellule tumorali o mediante il contatto diretto cellula-cellula¹⁹. I leucociti attivati, in particolare i neutrofili, favoriscono la crescita tumorale e la diffusione metastatica, aderendo alle cellule tumorali e facilitandone la migrazione attraverso gli endoteli⁴.

Le MP rilasciate dalle piastrine mostrano un'elevata attività pro-tumorale, dovuta all'elevato contenuto di fattori pro-angiogenici derivanti dagli alfa-granuli delle piastrine di origine, all'espressione di molecole di adesione ed alla loro capacità di indurre, a loro volta, il rilascio di fattori pro-angiogenici da parte delle cellule tumorali. Il TF, espresso dalle MP, rappresenta un altro importante meccanismo che è coinvolto nella progressione tumorale². Infine, il trasferimento di MP tra le cellule tumorali favorisce la propagazione orizzontale di oncogeni e del fenotipo ad essi associato²⁰. In definitiva, esiste un collegamento reciproco fra trombosi e cancro, attraverso il quale le cellule tumorali promuovono la formazione dei trombi e le proteine della coagulazione favoriscono la crescita e la metastatizzazione tumorale.

Conclusioni

L'attivazione dei meccanismi della coagulazione accompagna lo sviluppo di una neoplasia. Pertanto uno stato latente di ipercoagulabilità è presente, in misura diversa, in quasi tutti i pazienti neoplastici. Tale attivazione è verosimilmente espressione di malignità, in quanto appare sempre più evidente che il fenotipo pro-trombotico, espresso dalla maggior parte delle cellule tumorali, è guidato dagli stessi oncogeni che determinano la trasformazione neoplastica delle cellule. Le proteine dell'emostasi o eventi molecolari da esse determinati entrano nella biologia del tumore, favorendone la crescita e la progressione. L'inibizione di tali meccanismi può rappresentare un approccio innovativo alla cura del cancro.

Ringraziamenti: Si ringrazia l'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC, grant IG10558 e grant "5 per mille" 12237) per il supporto ai progetti di ricerca del laboratorio della dott.ssa A. Falanga.

Bibliografia

1. Rickles FR, A. Falanga. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb Res.* 2001; 102: V215-V224.
2. Falanga A, Tartari CJ, Marchetti M. Microparticles in tumor progression. *Thrombosis Research.* 2012; 129 (Suppl. 1): S132-S136.

3. Weitz IC, et al. Chemotherapy-induced activation of hemostasis: effect of a low molecular weight heparin (dalteparin sodium) on plasma markers of hemostatic activation. *Thromb Haemost.* 2002; 88: 213-220.
4. Falanga A, Panova-Noeva M, Russo L. Procoagulant mechanisms in tumour cells. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2009; 22: 49-60.
5. Regina S, et al. Increased tissue factor expression is associated with reduced survival in non-small cell lung cancer and with mutations of TP53 and PTEN. *Clin Chem:* 2009; 55: 1834-1842.
6. Magnus N, Garnier D, Rak J. Oncogenic epidermal growth factor receptor up-regulates multiple elements of the tissue factor signaling pathway in human glioma cells. *Blood.* 2010; 116: 815-818.
7. Fernandes RS, et al. On the molecular mechanisms for the highly procoagulant pattern of C6 glioma cells. *J Thromb Haemost.* 2006. 4: 1546-1552.
8. Nadir Y, et al. Heparanase induces tissue factor pathway inhibitor expression and extracellular accumulation in endothelial and tumor cells. *Thromb Haemost.* 2008; 99: 133-141.
9. Falanga A, et al. Cancer procoagulant and tissue factor are differently modulated by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood.* 1998; 92: 143-151.
10. Tesselaar ME, et al. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 520-527.
11. Del Conde I, et al. Microvesicle-associated tissue factor and Trousseau's syndrome. *J Thromb Haemost.* 2007; 5: 70-74.
12. Hron G, et al. Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thromb Haemost.* 2007; 97: 119-123.
13. Kim HK, et al. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer.* 2003; 39: 184-191.
14. Davila M, et al. Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation. *J Thromb Haemost.* 2008; 6: 1517-1524.
15. Alessio MG, et al. Cancer procoagulant in acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol.* 1990; 45: 78-81.
16. Liu Y, et al. The expression of annexin II and its role in the fibrinolytic activity in acute promyelocytic leukemia. *Leuk Res.* 2011; 35: 879-884.
17. Rickles FR, Patierno S, Fernandez PM. Tissue factor, thrombin, and cancer. *Chest.* 2003; 124 (Suppl. 3): 58S-68S.
18. Palumbo JS, et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood.* 2005; 105 (1): 178-185.
19. Lowe KL, Navarro-Nunez L, Watson SP. Platelet CLEC-2 and podoplanin in cancer metastasis. *Thrombosis Research.* 2012; 129 (Suppl. 1): S30-S37.
20. Rak J. Microparticles in cancer. *Semin Thromb Hemost.* 2010; 36 (8): 888-906.
21. Marchetti M, et al. All trans-retinoic acid modulates the procoagulant activity of human breast cancer cells. *Thromb Res.* 2011; 128: 368-374.

Infiammazione, immunità e progressione tumorale

Paola Allavena

Laboratorio di Immunologia Cellulare, IRCCS Istituto Clinico e Ricerca Humanitas, Rozzano (MI)

L'ipotesi che il ruolo protettivo del sistema immunitario si estendesse, oltre ai patogeni, anche a cellule trasformate, risale alla metà del secolo scorso, ma ha richiesto alcuni decenni per la sua dimostrazione. Oggi sappiamo che in assenza di difese immunologiche c'è una maggiore incidenza di tumori, e che le cellule tumorali possono innescare una risposta immunitaria perchè esprimono antigeni "riconoscibili" dal sistema immunitario. Tuttavia, se alcune cellule tumorali non vengono eliminate e riescono a sfuggire al controllo immunitario, continuano a proliferare diventando tumori clinicamente manifesti. Negli ultimi anni si è compreso che il rapporto immunità e tumori è molto complesso e i diversi tipi di cellule immunitarie possono avere attività funzionali diverse e addirittura opposte. In uno schema semplificato, l'immunità adattativa, in particolare i linfociti T citotossici, svolgono un ruolo protettivo contro il tumore, mentre l'immunità innata, ed in particolare i macrofagi, possono favorirne la progressione.

Inoltre, il micro-ambiente tumorale è molto ricco di mediatori biologicamente attivi, prodotti sia dai leucociti che dal tumore stesso, che influenzano le attività funzionali delle varie cellule (citochine, chemochine, fattori di crescita, enzimi). Citochine immuno-stimolatorie (IL-2, IL-12, Interferone γ) possono attivare risposte anti-tumorali, mentre citochine immunosoppressive (IL-10, TGF β) possono reprimerle. La composizione del micro-ambiente, quindi, ovvero la prevalenza dell'immunità innata o adattativa e di specifici mediatori solubili, determinerà se ci sono le condizioni per attivare una efficace risposta immunitaria in grado di eliminare il tumore, o se al contrario il tumore riuscirà ad evadere il controllo dell'immunità. L'interazione del sistema immunitario con il tumore è quindi di fondamentale importanza nel determinare la progressione o regressione della malattia.

Infiammazione, immunità innata e tumori

I meccanismi dell'immunità innata (o risposta infiammatoria acuta) costituiscono una prima barriera di difesa nei confronti dei patogeni. Dal punto di vista cellulare essi sono costituiti dai fagociti (fagociti mononucleati o monociti-macrofagi e polimorfonucleati) e dalle cellule NK, anche se per queste ultime è difficile l'as-

segnazione alla immunità innata o all'immunità specifica, data la loro capacità di riconoscere le molecole del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC) di classe I. Dal punto di vista umorale, le molecole circolanti dell'immunità innata (ante - anticorpi) sono costituite dalle pentraxine, quali la proteina C reattiva, dalla lectina che lega il mannosio e da componenti della cascata complementare. Le cellule dell'immunità innata comunicano ed agiscono attraverso le citochine infiammatorie primarie, prototipo delle quali sono interleuchina-1 (IL-1) e il fattore di necrosi tumorale (TNF). Il ruolo dei meccanismi dell'immunità innata nei tumori, in particolare dei fagociti mononucleati e delle risposte infiammatorie croniche, è stato oggetto di intensa discussione ed è andato incontro a profonda revisione nel corso del tempo.

Il micro-ambiente infiammatorio dei tumori

Nel 1863 Rudolf Virchow identificò la presenza di un infiltrato linforeticolare nei tessuti neoplastici, e suggerì che la presenza di leucociti dell'ospite all'interno dei tumori fosse il riflesso dell'origine del cancro nelle sedi di infiammazione cronica. Benché questa visione abbia avuto fortune alterne per oltre un secolo, le evidenze raccolte negli ultimi 20 anni, soprattutto riguardo il microambiente infiammatorio nei tessuti neoplastici, indicano un legame stretto fra cancro e infiammazione cronica. Si stima che circa il 15% dei tumori siano associati a patologie infettive croniche. Inoltre una serie di patologie autoimmuni e infiammatorie di origine ignota o indotte da agenti chimici e fisici, sono associate a un aumento del rischio di patologia maligna. Si ritiene quindi che l'infiammazione e il cancro si influenzino a vicenda. Le cellule e i mediatori dell'infiammazione costituiscono una parte importante del microambiente tumorale. In alcuni tumori la condizione infiammatoria precede lo sviluppo della neoplasia. In altri casi eventi genetici (come l'attivazione di diversi tipi di oncogeni per mutazione, riarrangiamento o amplificazione cromosomici, e/o l'inibizione di geni che sopprimono il tumore) inducono nelle cellule così trasformate la produzione di mediatori infiammatori, anche in assenza di sottostanti condizioni infiammatorie/infettive (per esempio i tumori della mammella). Qualunque sia la causa dell'infiammazione, nelle cellule tumorali vengono attivati i fattori di trascrizione che controllano la produzione di mediatori infiammatori, incluse le citochine, chemochine, e prostaglandine. Questi fattori richiamano dal circolo sanguigno i leucociti, soprattutto quelli della linea mielomonocitaria, che una volta arrivati nello stroma tumorale perpetuano e amplificano la cascata infiammatoria.

I macrofagi associati ai tumori

I leucociti che infiltrano i tumori comprendono sia cellule dell'immunità innata (macrofagi, cellule mieloidi immature, eosinofili e cellule NK) che cellule dell'immunità adattativa (linfociti T e B). Dal punto di vista numerico, i macrofagi costituiscono in genere la principale componente dell'infiltrato leucocitario nella maggior parte delle neoplasie. I macrofagi associati ai tumori (TAM =

Tumor Associated Macrophages) derivano dai monociti circolanti e sono attratti all'interno della massa tumorale da citochine dotate di attività chemiotattica, in particolare dalle chemochine. Le cellule tumorali producono comunemente diverse chemochine, in particolare la chemochina nota come Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1), ora denominata CCL2. Inoltre molti tumori producono fattori, come il Colony Stimulating Factors macrofagico (M-CSF), che attiva i macrofagi e prolunga la loro sopravvivenza all'interno dei tumori.

I macrofagi sono cellule ad alta plasticità che possono svolgere attività funzionali anche molto distinte, quali la fagocitosi e uccisione di patogeni, il riparo delle ferite e il rimodellamento dei tessuti. Se opportunamente stimolati, come si può ottenere in vitro con endotossina e Interferon γ , i macrofagi (di tipo M1) sono in grado di essere citotossici nei confronti delle cellule tumorali. Tuttavia nei tumori, i TAM non sono in genere citotossici, anzi, proprio il micro-ambiente tumorale ne condiziona l'attività funzionale in tal modo che questi sono indotti a comportarsi come nel riparo dei tessuti danneggiati, cioè producendo fattori di crescita epiteliali e mediatori dell'angiogenesi (Macrofagi di tipo M2) (Fig. 1). Infatti i TAM sono in grado di stimolare la proliferazione e l'invasività delle cellule tumorali, favorendone la metastatizzazione; promuovono la neo-angiogenesi e sopprimono le risposte anti-tumorali. In linea con queste funzioni pro-tumorali, in diverse neoplasie umane, la presenza abbondante di TAM nell'infiltrato tumorale è associata a progressione del tumore, resistenza alle terapie e prognosi infausta (Fig. 2).

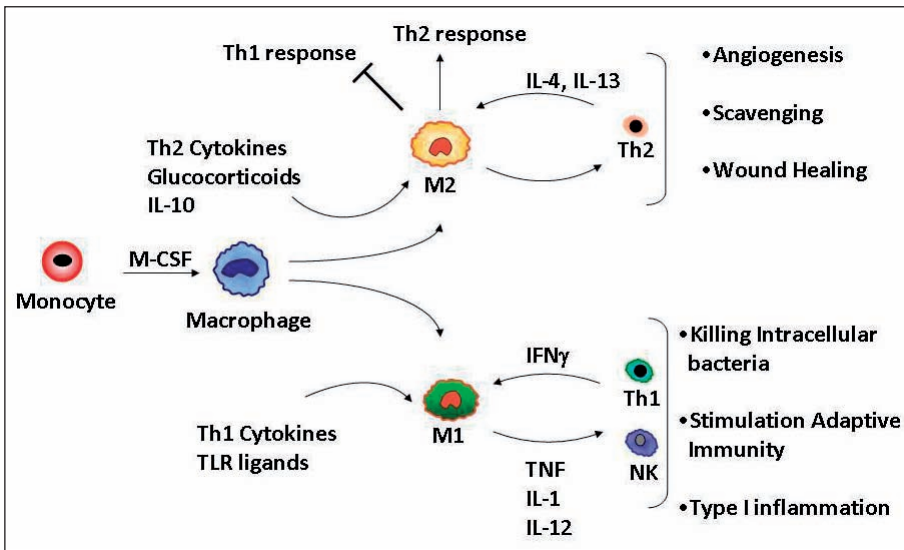


Fig. 1 - Polarizzazione dei macrofagi (bilancia macrofagica). La differenziazione dei monociti a macrofagi è diretta dai segnali presenti nel micro-ambiente. Citochine di tipo Th1 (es. $\text{IFN}\gamma$) e prodotti batterici (es. LPS o ligandi dei Toll-like receptors, TLR) promuovono macrofagi del tipo M1, che sono efficaci nella difesa contro patogeni intra-cellulari e che sostengono le risposte immunitarie Th1. Citochine di tipo Th2 (es. IL-4, IL-13) e IL-10 e glucocorticoidi promuovono macrofagi di tipo M2 che bloccano le risposte immunitarie Th1 e promuovono la guarigione dei tessuti danneggiati e l'angiogenesi. I macrofagi associati al tumore sono prevalentemente di tipo M2 e favoriscono la progressione tumorale.

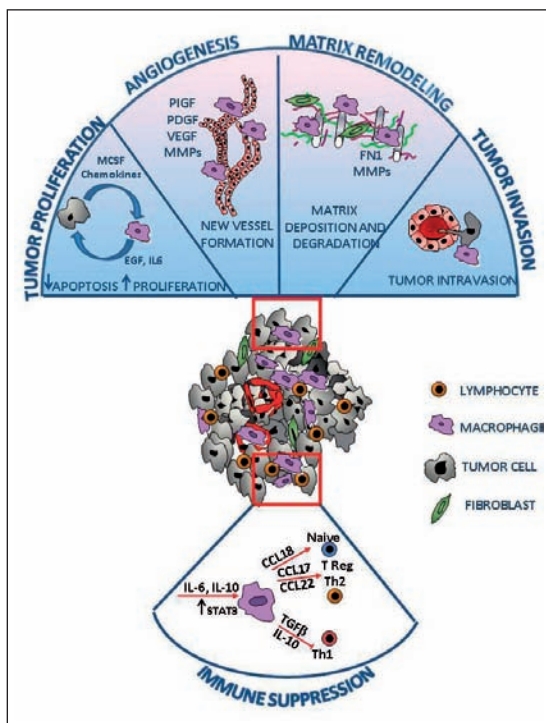


Fig. 2 - Schema delle funzioni pro-tumorali dei Macrofagi Associati ai Tumori (TAM). I TAM promuovono la sopravvivenza delle cellule neoplastiche e stimolano la loro proliferazione, producendo diversifattori di crescita e citochine (es. EGF, IL-6); producono fattori angiogenici (es. VEGF, MMPs) che stimolano l'angiogenesi e rimodellano la matrice, ma anche producono proteine della matrice, come fibronectina (FN1); favoriscono anche la disseminazione delle cellule tumorali favorendo l'invasione. Infine, hanno funzioni soppressive: producono IL-10 e TGF β che sopprimono le risposte immunitarie di tipo Th1, e chemochine (es. CCL17, CCL18, CCL22) che richiamano cellule linfoidi prive di attività citotossica (Th2, linfociti naive) o aventi funzioni soppressive (Treg).

L'ambivalenza e ambiguità del ruolo dei macrofagi nel controllo della crescita neoplastica si esprime bene con l'esempio della "bilancia macrofagica", ovvero: macrofagi con caratteristiche e funzioni distinte possono dare risultati differenti in stadi diversi della crescita del tumore o in un contesto terapeutico. Nei primi stadi della cancerogenesi le risposte innate hanno un ruolo positivo e sono probabilmente coinvolte nell'attivazione di una sorveglianza efficace mediata dall'immunità adattativa che elimina le cellule tumorali; quando il tumore è ormai stabilizzato e le cellule neoplastiche sono sfuggite al controllo immunologico, l'infiammazione lenta e continua sostenuta dai TAM ne favorisce la crescita.

La matrice extra-cellulare del micro-ambiente tumorale

Nell'ultimo decennio il concetto che la matrice extra-cellulare (ECM) sia semplicemente una struttura di supporto per la conservazione dell'architettura tissutale è fortemente cambiato. Infatti, i componenti dell'ECM possono fornire segnali per l'adesione cellulare, la migrazione, la proliferazione e la differenziazione dei tessuti. In particolare, i frammenti degradati delle molecole ECM o la loro espressione aberrante come avviene durante la trasformazione neoplastica possono attivare reazioni infiammatorie. La matrice interstiziale è una rete intricata e dinamica di fibre composte da glicosaminoglicani (GAG) contenenti glicoproteine. I diversi tipi di collagene, la fibronectina, l'acido ialuronico e i proteoglicani conferiscono

resistenza meccanica, elasticità e una precisa organizzazione spaziale dei tessuti. La matrice dei tessuti è anche una fonte di fattori di crescita, che sono legati in una forma inattiva alle proteine ECM, ma che possono essere rapidamente rilasciati in caso di necessità, ad esempio durante la riparazione tissutale. Nei tessuti normali, le cellule stromali residenti (fibroblasti, leucociti, cellule endoteliali) sono tipicamente quiescenti. Nei tumori, il contrasto è macroscopicamente evidente, come osservato dai patologi oltre 100 anni fa. Lo stroma tumorale è molto eterogeneo e le cellule che lo infiltrano molto più abbondanti, con fibroblasti attivati, vasi irregolari e numerosi leucociti infiammatori.

Nello stroma normale ogni tipo di cellula esprime recettori di superficie adeguati al suo comportamento fisiologico; le proteine della matrice agiscono in modo cooperativo per modulare l'interazione tra i diversi componenti cellulari e tengono sotto stretto controllo i vari processi cellulari come la proliferazione, la morte, l'adesione, la migrazione, l'espressione genica e la differenziazione, e sono fondamentali per mantenere l'omeostasi dei tessuti. Lo stroma tumorale, al contrario, è caratterizzato da un sovvertimento dell'architettura tissutale, da una rete vascolare disorganizzata e da una diversa composizione di alcuni componenti della matrice. In effetti, i tessuti neoplastici sembrano essere in un continuo stato di riparo dello stroma come succede nei tessuti normali dopo un ferita. Probabilmente la caratteristica più rilevante dello stroma tumorale è il continuo stato di attivazione dei numerosi enzimi proteolitici che degradano le proteine. Questo fenomeno comporta diverse conseguenze: ad esempio, si altera la rigidità dello stroma e vengono rimosse le barriere fisiche tra le cellule, facilitando l'invasione delle cellule migranti (neoplastiche ed endoteliali); inoltre, i fattori di crescita "nascosti" nella matrice vengono rilasciati in forma attiva e stimolano direttamente la sopravvivenza delle cellule tumorali, la loro proliferazione e motilità, ed il switch angiogenico.

Ruolo dei macrofagi nella degradazione e rimodellamento della matrice e nella nicchia metastatica

Le proteine della matrice sono degradate da enzimi proteolitici specifici che possono essere raggruppati in grandi famiglie e includono le metalloproteasi (MMPs), le catepsine, le ialuronidasi, le proteasi ADAM, ma anche molte altre. I tumori hanno un elevato turnover di deposizione delle proteine ECM e di attività proteolitica ad opera sia delle cellule neoplastiche che dei fibroblasti, ma sono soprattutto i macrofagi dello stroma tumorale ad esprimere una elevata attività proteolitica. I macrofagi regolano anche in modo importante la deposizione di matrice operata dai fibroblasti. Infatti i TAM producono diversi fattori di crescita in grado di attivare i fibroblasti: EGF, FGF, PDGF e soprattutto TGF-beta. Inoltre, anche i macrofagi producono proteine della matrice, ad esempio fibronectina, collagene, osteopontina e vari proteoglicani.

Negli ultimi anni si è compreso che diversi componenti della matrice svolgono un ruolo essenziale per sostenere la sopravvivenza di cellule metastatiche. Infatti, per attecchire in modo efficiente, le cellule tumorali che si sono staccate del tumo-

re primario devono resistere ad un ambiente spesso non permissivo e mantenere vitalità e potenziale proliferativo. Numerose evidenze indicano che per adattarsi al nuovo sito le cellule tumorali “condizionano” il microambiente per generare un nicchia favorevole, o nicchia metastatica. È stato dimostrato che la tenascina C, una proteina della matrice espressa nelle nicchie di cellule staminali normali, è anche una componente importante della nicchia metastatica e promuove la sopravvivenza delle cellule tumorali.

Abbiamo visto che i macrofagi co-operano alla formazione di un ambiente favorevole per le cellule tumorali. Studi recenti hanno dimostrato che il reclutamento di monociti/macrofagi nei siti metastatici facilita l’attecchimento delle metastasi. Cellule tumorali migranti che si fermano in un sito metastatico producono chemochine (es. CCL2) o altri fattori che attirano i monociti circolanti. Questi a loro volta produrranno fattori di crescita per il tumore e per i vasi, favorendone la sopravvivenza anche in un ambiente ostile.

Bibliografia essenziale

1. Allavena P, Mantovani A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clin Exp Immunol.* 2012; 167: 195-205.
2. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 329-360.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144: 646-674.
4. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9: 239-252.
5. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008; 454: 436-444.
6. Oskarsson T, Acharyya S, Zhang XH, Vanharanta S, Tavazoie SF, Morris PG, Downey RJ, Manova-Todorova K, Brogi E, Massagué J. Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat Med.* 2011; 17: 867-874.

Meccanismi di fuga dall'immunità antitumorale e cellule staminali tumorali

Giorgio Parmiani, Cristina Maccalli

Unità di Immuno-Bioterapia del Melanoma e dei Tumori Solidi, Divisione di Oncologia Molecolare, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

La risposta immune ai tumori, i meccanismi di elusione delle cellule tumorali

Verranno analizzate le diverse possibili risposte specifiche di linfociti T o NK contro le cellule neoplastiche umane e i diversi, numerosi meccanismi che consentono alla cellula tumorale di resistere alla reazione del sistema immune (Rivoltini et al., 2005; Ribas 2012) (Tab. 1). Nuove ricerche hanno però consentito di dimostrare una associazione tra tipo di infiltrato tumorale in termini di sottopopolazioni linfocitarie T o NK e prognosi di molti tumori umani (Pagès et al., 2010).

Cellule staminali tumorali isolate da pazienti con tumori solidi

Il glioblastoma multiforme

Il principale obiettivo del nostro studio era di valutare se le cellule staminali tumorali (o cancer stem cells, o Cancer Initiating Cells, CSC/CIC) isolate da glioblastoma multiforme (GBM) possono rappresentare un bersaglio per il trattamento immunoterapico di pazienti con questa neoplasia.

Abbiamo dimostrato che le GBM CSC/CIC hanno una limitata immunogenicità, suscitano per lo più risposte Th2 sia in un contesto autologo sia allogenico e sono in grado di inibire la proliferazione delle cellule T rispetto alle loro controparti

Tab. 1 - Factors that interfere with the T cell-mediated anti-tumor response.

Tumor (Immunosubversion)	Immune system
<ul style="list-style-type: none"> • Lack of antigens or down-regulation of HLA • Dysfunction of antigen presentation • Release of immune-suppressive factors (IL-10, TGFβ, VEGF) • Tumour counterattack (Fas/FasL) • IDO, SPARC • Expression of FoxP3, CTLA4 • Tumor ER stress • NFAT1, Tie+ Monocytes 	<ul style="list-style-type: none"> • Immune anergy or ignorance • Lack of tissue homing molecules; defective adhesion • T-cell receptor dysfunction • Inactivation of T-cells within the tumor environment (granzyme B) • T-regulatory cells • MDSC • Epithelial/mesenchymal transition • Galectin-3

Tab. 2 - Riconoscimento da parte dei linfociti T autologhi delle linee CSC/CICs o FBS isolate da pazienti con GBM.

Patient	T cell line	Autologous CSC recognition	Autologous FBS tumor cell recognition	MHC-restriction	Cytokine release	TH type subset	Cytotoxic activity
070104	N.2	+++	N. A.	MHC I	IFN- γ	TH1	+++ (CD107 mobilization)
	N.3	+++	N.A.	MHC II	IFN- γ	TH1	-
080325	N1	+	+++	MHC II	IL-5	TH2	N.D.
	N2	++	+++	MHC I	IFN- γ	TH1	N.D.
	N4	+	++	MHC II	IL-5	TH2	N.D.
080125	N4	+	++	MHC II	IL-5	TH2	N.D.
080418	N1	+	+	-	IL-5	TH2	N.D.

N.A.: not available; N.D.: not done.

non-CSC mantenute in terreno con FBS (Di Tomaso et al., 2010) (Tab. 2). Questa inibizione mediata dalle GBM CSC è indipendente dalla secrezione di TGF β -1/2, di IL-10 e IL-13 che risultavano non rilevabili nel soprannatante di queste linee cellulari. Abbiamo visto che sia le CSC/CIC sia le cellule tumorali FBS esprimono molecole inibitrici della risposta immunitaria, come CTLA-4, PD-1 e PDL-1. Inoltre è stato identificato un profilo genetico differenziale tra CSC/CIC e le linee FBS, confermato a livello proteico per alcune molecole legate alla risposta immune. Un enzima che regola negativamente la risposta immunitaria è indolamina 2,3-diossigenasi (IDO), implicato nella generazione della tolleranza immunitaria. Mediante RT-qPCR abbiamo rilevato l'espressione di mRNA di questa molecola sia in CSC sia nelle linee tumorali FBS con un aumento significativo in seguito a trattamento delle cellule con IFN- γ . L'attività funzionale di IDO è stata valutata determinando, con un saggio colorimetrico, il catabolismo del triptofano mediato da IDO; in particolare, in alcuni casi una maggiore attività è stata vista essere associata al trattamento con IFN- γ delle CSCs, ma non nelle loro controparti FBS. È interessante notare che l'attività di IDO è stata inibita dal trattamento di queste cellule con l'inibitore specifico 1-Metil Triptofano (1-MT). Con la colorazione

Tab. 3 - Il blocco della molecola immuno-modulante IDO può aumentare l'efficienza di proliferazione da parte dei linfociti T co-incubati con CSC/CICs.

Cell line	Treatment	PHA/Con-A	Proliferation index
PBMCs	-	-	1.34 (19.9)
PBMCs	-	+	4.06 (81.3)
T98 CSCs	-	+	2.23 (18.7)
	+ IFN- γ	+	1.06 (1.74)
	+ IFN- γ + 1-MT	+	2.4 (73.4)
T98 FBS	-	+	2.45 (11.8)
	+ IFN- γ	+	1.83 (7.4)
	+ IFN- γ + 1-MT	+	2.07 (9.93)

I linfociti T erano stati marcati con CFSE e poi incubati per 48 ore con cellule CSC/CIC o FBS in presenza o meno di 1000IU di IFN-g con o senza l'inibitore di IDO 1L-MT. La proliferazione è stata valutata con IFe analisi citofluorimetrica sulle cellule CD3+. I risultati sono rappresentati come indice di proliferazione: numero totale di divisioni cellulari diviso il numero di cellule che si sono divise; in parentesi è rappresentata la percentuale di cellule che si sono divise.

CFSE di linfociti del sangue periferico (PBL) da donatori sani e analisi citofluorimetrica abbiamo osservato che l'inibizione della proliferazione di questi PBL, co-coltivati con CSC allogene, è mediata da IDO, come suggerito dalla capacità del trattamento con 1-MT di ripristinare la proliferazione dei PBL (Tab. 3). Risultati simili sono stati osservati da co-culture di CSC, trattate o non, con IFN- γ e 1-MT con i linfociti autologhi. Inoltre, abbiamo eseguito uno studio di espressione di 704 miRNA mediante RT-qPCR in linee CSC isolate da tre pazienti con GBM. È stato trovato un profilo miRNA associato alle CSC che mostra che 10 miRNA sono ipo-espressi (9-703 fold-change, $p < 0,005$) e 33 sono iper-espressi (10-120 fold-change, $p < 0,005$) preferenzialmente nelle CSC rispetto alle controparti FBS. In futuro, sfrutteremo questa informazione per convalidare il ruolo immunomodulante di alcuni di questi miRNA.

In conclusione abbiamo dimostrato che le CSC/CIC hanno un ruolo immunosoppressorio verso le risposte T anti-tumore e che il catabolismo del triptofano è responsabile di questo fenomeno.

CSC/CIC da carcinomi colo-rettali

Recentemente nel nostro laboratorio CSC/CIC sono state isolate anche da campioni di tessuto provenienti da pazienti con diagnosi di carcinoma del colon-retto (Volontè et al., 2013). In parallelo è stata isolata e stabilizzata *in vitro* dagli stessi tessuti in presenza di FBS la controparte di cellule "non-CSC/CIC", definite come cellule FBS.

Lo scopo principale di questo studio è stato quello di effettuare una caratterizzazione immunologica di cellule staminali tumorali del carcinoma del colon-retto (CRC) e di capire se queste cellule possono rappresentare un bersaglio per interventi di immunoterapia. Il fenotipo di queste linee cellulari è stato analizzato tramite immuno-fluorescenza e citofluorimetria, mentre la loro effettiva tumorigenicità è stata verificata attraverso l'utilizzo di xenotrapianti in topi immunodeficienti (NOD/SCID).

Inizialmente sono stati analizzati i livelli di espressione di molecole associate al tumore del colon-retto e alle cellule staminali, tra le quali: Ep-CAM, HCAM, CEA, CD44, Aldefluor, CD133, SOX-2, Nanog e OCT-4.

Gli inoculi seriali in topi immunodeficienti hanno confermato il maggiore potenziale tumorigenico delle CSC/CIC rispetto a quello delle linee FBS. Gli xenotrapianti generati dalle CSC/CIC mostravano infatti ampie aree di necrosi rispetto ai tessuti tumorali generati dalle FBS, indice di un'intensa attività proliferativa e l'analisi di immunoistochimica relativa ad alcune delle principali molecole associate alle cellule staminali e al CRC, ha messo in evidenza come gli xenotrapianti generati dalle CSC/CIC mostrassero un fenotipo più affine a quello del tumore primario di origine, rispetto alle linee FBS.

In seguito abbiamo studiato l'espressione delle molecole MHC di classe I e di classe II, dei ligandi di NKG2D, di molecole immunoregatorie e delle molecole coinvolte nel processamento e nella presentazione (*antigen presenting molecules*, APM) degli antigeni associati ai tumori.

Sia le CRC CSC/CIC che le linee FBS erano debolmente positive per MHC di classe I e negative per MHC di classe II, mentre i ligandi di NKG2D erano comunemente espressi in entrambi i tipi cellulari.

Le molecole appartenenti all'APM erano principalmente difettive nelle CSC/CIC di entrambi i tipi tumorali (GBM e CRC) rispetto alle linee cresciute in FBS. Successivamente abbiamo indagato se le linee cellulari isolate da CRC potessero esprimere alcune molecole, tra cui CTLA-4, PD-1, B7-H3, in grado di regolare negativamente la risposta dei linfociti T attraverso la modulazione del secondo segnale richiesto per la completa attivazione dei linfociti T. Tutte le CSC/CIC e le linee FBS erano omogeneamente positive per CTLA-4 e PD-1 e, inoltre, esprimevano alti livelli di PD-L1 e B7-H3. In aggiunta abbiamo osservato che tutte le cellule analizzate esprimevano sia nel citoplasma che in membrana la citochina IL-4, mentre il recettore di quest'ultima (IL-4R) era debolmente presente a livello della membrana delle CSC/CIC e assente in tutte le linee FBS. Questi dati confermerebbero la probabile produzione autocrina di IL-4 da parte delle CSC/CIC e delle linee FBS come è stato proposto dal gruppo di Stassi (Todaro et al., 2007). Inoltre, questa citochina potrebbe svolgere un ruolo immunomodulatorio nei confronti delle risposte mediate dai linfociti $T\alpha\beta$ (Volontè et al., 2013) o $T\gamma\sigma$ (Todaro et al., 2009) dirette contro il CRC. Inaspettatamente si è osservato che le linee FBS rilasciavano nel supernatante di coltura elevati livelli di prostaglandina-E2 (PGE2) che, al contrario, non venivano viste oppure venivano rilasciate a bassi livelli nei surnatanti delle CSC/CIC.

Inoltre è stato verificata l'efficienza di induzione di risposte anti-CRC mediate dai linfociti T isolati dal sangue periferico di pazienti con tumore mediante la loro stimolazione *in vitro* con le CSC/CIC o le linee FBS autologhe. In un paziente con CRC (#1076) è stato possibile isolare linfociti T di tipo TH1 (definiti sulla base della secrezione di IFN- γ) che mostravano riconoscimento debole delle CSC/CIC. Al contrario una più efficiente secrezione di IFN- γ veniva misurata in seguito alla stimolazione di queste cellule T con le cellule FBS. In un secondo paziente (#1247) è stato osservato un riconoscimento delle CSC/CIC in modo indipendente dalle molecole MHC, suggerendo una reattività di tipo NK. Queste osservazioni erano anche confermate dall'analisi fenotipica dei linfociti che evidenziava un arricchimento 20-30% di cellule di tipo NK (CD3- CD16+CD56+). Tali risultati correlano con l'osservazione che le CSC/CIC avevano una espressione difettiva delle molecole coinvolte nel processamento e nella presentazione degli antigeni associata alle molecole MHC.

Sulla base dei risultati ottenuti possiamo concludere che abbiamo isolato anche da tessuti di CRC cellule con proprietà di staminalità. Queste cellule tuttavia confrontate con la controparte FBS, mostravano una minore immunogenicità. Linfociti T anti-CRC sono stati isolati dai pazienti con tumore che tuttavia mostravano maggiore reattività verso le cellule FBS rispetto alle CSC/CIC. Nel caso di un paziente sono state misurate *in vitro* risposte immunologiche preferenzialmente di tipo NK. Le nostre osservazioni, quindi, potranno essere utili per disegnare nuovi protocolli di immunoterapia per pazienti con CRC e sottolineano la necessità di identificare nuovi antigeni al fine di ripristinare l'immunogenicità delle CSC/CIC.

Bibliografia essenziale

1. Di Tomaso T, Mazzoleni S, Wang E, Sovena G, Clavenna D, Franzin A, Mortini P, Ferrone S, Doglioni C, Marincola FM, Galli R, Parmiani G, Maccalli C. Immuno-biological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients. *Clin Cancer Res.* 2010; 16: 800-813.
2. Pagès F, Galon J, Dieu-Mosjean M-C, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman W-H. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Int J Cancer.* 2010; 29: 1093-1102.
3. Ribas A, Tumeh PC. Tumours switch to resist. *Nature.* 2012; 490: 347-348.
4. Rivoltini L, Canese P, Huber V, Iero M, Pilla L, Valenti R, Fais S, Lozupone F, Casati C, Castelli C, Parmiani G. Escape strategies and reasons for failure in the interaction between tumor cells and the immune system: How can we tilt the balance toward immune-mediated cancer control? *Exp Opin Biol Ther.* 2005; 5: 463-476.
5. Todaro M, D'Asaro M, Caccamo N, Iovino F, Francipane MG, Meraviglia S, Orlando V, La Mendola C, Gulotta G, Salerno A, Dieli F, Stassi G: Efficient killing of human colon cancer stem cells by g*s*T lymphocytes. *J Immunol.* 2009; 182: 7287-7296.
6. Todaro M, Perez Alea M, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, Tripodo C, Russo A, Gulotta G, Medema JP, Stassi G. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of Interleukin-4. *Cell Stem Cells* 2007; 1: 389-402.
7. Volontè A, Di Tomaso T, Spinelli M, Sanvito M, Albarello L, Bissolati M, Ghirardelli L, Orsenigo E, Ferrone S, Doglioni C, Dellabona P, Staudacher C, Parmiani G, Maccalli C. Cancer stem cells from human colorectal tumors can be targeted by autologous T lymphocytes by blocking the IL-4 suppressive signal: implications for cancer immunotherapy *Clin Cancer Res*, 2013, under revision.

Mesenchymal stromal/stem cells: support or suppress tumor growth?

*Massimo Dominici, Naomi D'Souza, Carlotta Spano, Paolo Paolucci,
Giulia Grisendi*

Laboratorio di Biologia Cellulare e Terapie Oncologiche Avanzate, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Materno-Infantili e dell'Adulto, Università di Modena e Reggio Emilia

The Tumor-associated fibroblasts

Tumor-associated fibroblasts (TAF) are frequent cell type within the tumor stroma of many cancers, most notably breast and pancreatic carcinoma where they are relatively absent in corresponding normal tissue. They may be recruited regionally or from circulating populations.

(Spaeth et al., 2008; Mishra et al., 2008) and play a critical role in tumor remodeling, tumor growth and metastasis and structural matrix forma (Mishra et al., 2011; Yang et al., 2011). TAF generally favor the transition of non-tumorigenic cells towards tumorigenic clones clones (Tisty 2001).

TAF are highly heterogeneous cellular elements and can be derived from different sources (Grisendi et al., 2011). Dissecting their origin may be important in a broader comprehension of cancer development. Major hypotheses are indicating that TAF may be derived from resident elements, from a circulating pool or both. Various data indicate that TAF can be derived from pre-existing fibroblasts residing normally in tissues through signals from soluble products and ECM changes that are present at the tumor microenvironment, often originating from cancer cells themselves. A study of TAF, derived from liver colorectal cancer metastasis, suggested a local source of these cells as TAF were found to express markers similar to those of local resident fibroblasts (Mueller et al., 2007). TAF may also originate from epithelial precursors accordingly to an abnormal biological event defined as 'Epithelial to mesenchymal transition' (EMT). EMT first coined by Krug et al. in 1987 is a critical process in embryogenesis (Thiery & Sleeman 2006) and may occur in several epithelial cell types in post-natal life.

It has been also reported that a circulating pool of cells deriving from bone marrow (BM) contribute to tumor stroma and, more specifically, to TAF. BM contains several progenitors having multipotent differentiation capacity (Graf 2002). In particular, bone marrow derived mesenchymal elements have been called for this specific function. Evidence for a BM source of TAF comes from studies using a

gastric cancer mouse model, in which BM transplantation experiments indicated that subsets of gastric myofibroblasts were indeed derived from the BM (Guo et al., 2008). Further studies based on BM transplants in animal models, have estimated that BM-MSc may contribute as much as 20% to the TAF population (Quante et al., 2011).

The biological identity of these cells is still under investigation but mesenchymal stromal/stem cells (MSC) have been identified as possible precursors (Direkze et al., 2004). Similarly, white adipose tissue (WAT) provided a functional cellular contribution with soluble factors that migrated to tumors and promoted neovascularization (Zhang et al., 2009). Recently it has been also shown that adipose tissue can release progenitors that migrate and contribute to tumor microenvironments (Kidd et al., 2012).

MSC and their relationship with TAF

Since both marrow and adipose mesenchymal progenitors may contribute to tumor stroma, it is necessary to understand the origins and evolution of this complex scenario in light of the MSC qualities of homing and differentiation potential. MSC are multipotent progenitor cells, first identified by Friedenstein et al. who described a population of plastic adherent cells isolated from BM with fibroblast like morphology (Friedenstein et al., 1974). MSC retain robust proliferation capacity thanks to a well-known clonogenic potential due to a self-renewal capacity (Caplan, 1991).

In addition to a proliferative phenotype, MSC display differentiation capacities that allow the generation of adipocytic, osteogenic, chondrogenic and myogenic lineages (Pittenger et al., 1999). Additionally, MSC can act by secreting bioactive molecules capable of influencing normal and pathological tissue homeostasis (Horwitz and Dominici, 2008). These functions are exerted either *ex vivo* or *in vivo*. In the latter case, a specific homing mechanism enhanced potential of therapeutic approaches aimed to regenerate several damaged organs (Pereira et al., 1995).

The identification of a conversion from MSC to TAF should be based on comprehensive characterization of their phenotypes, while *in vivo* this still remains to be elucidated; *in vitro* findings are more established. *Ex vivo* MSC expanded are usually negative for the hematopoietic cell surface biomarkers such as CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79 α or CD19 and HLA-DR expression (Dominici et al. 2006) but are positive for CD105 (endoglin), CD73 (ecto-5'-nucleotidase), CD44, CD90, CD71 (transferrin receptor), the ganglioside GD2, CD271 (low-affinity nerve growth factor receptor) and STRO-1 (Uccelli et al. 2008). Notably, *ex vivo* isolated TAF display several similarities to MSC, in particular TAF do express CD29, CD44, CD90, CD73 (Paunescu et al., 2011). Recently, our group reported that TAF isolated from primary lung tumor also expressed similar MSC immunophenotypic markers such as CD90, CD73 and CD105 (Grisendi et al. 2011). In agreement, TAF isolated from several pediatric tumors, such as neuroblastoma and sarcomas expressed typical MSC markers such as CD90, CD73 and CD105 and were negative for hematopoietic antigens (Johann et al., 2010).

Very interestingly, MSC may “sense” cancer as a damaged tissue event with inflammation and home to tumors accordingly (Lazennec and Jorgensen, 2008). Houghton et al. observed MSC engraftment into gastric glands in a model of gastric cancer (Houghton et al., 2004). Fulfilling all the prerequisite steps, systemically administered hMSC homed to the tumor site, preferentially survived, proliferated in the presence of malignant cells and become incorporated into the tumor architecture as stromal fibroblasts (Nakamizo et al. 2005). MSC tumor migration was motivated by many factors including tumor cell-specific receptors, ECM and soluble tumor derived factors such as SDF-1, TNF- α and interleukins (Komarova et al., 2010; Gao et al., 2009).

Mesenchymal stromal/stem cells (MSC) may support tumor growth

Given detailed interactions between MSC-TAF and tumor cells it is appreciated that the multiparametric mechanisms whereby MSC may enhance tumor growth are complex but generally dependent on cross-talk between the MSC and their target cells.

To a large extent, the function of MSC in tumors parallels their role in wound healing with MSC differentiating into pericytes and TAF (Spaeth et al., 2009; Short et al., 2003). Different reports have demonstrated that MSC can colonize metastatic tumors and in some models this favored metastasis (Karnoub et al., 2007; Bergfeld and DeClerck 2010). MSC co-injected subcutaneously with breast carcinoma cells enhanced metastatic ability in a CCL5-RANTES dependent manner, a chemokine secreted by the MSC upon induction by tumor cells (Karnoub et al., 2007). Similar studies also reported an increase of metastatic osteosarcoma lesions mediated by MSC-derived CCL5 (Xu et al., 2009).

Reciprocally, MSC secreting large amounts of CXCL12 and CXCL13 may attract different circulating tumor cells, including breast and myeloma cells (Urashima et al., 1997; Molloy et al., 2009). Subsequent interactions between tumor cells and MSC lead to the production of soluble factors (i.e. PGE2 and Galectin-3 binding protein) and cytokines including IL-6 (Sohara et al. 2005; Fukaya et al., 2008). IL-6 is a potent osteoclast-activating factor and also promotes tumor cell growth, survival and resistance to chemotherapy (Brocke-Heidrich et al., 2004; Sohara et al., 2005). Studeny et al. showed that by using BrdU staining methods MSC proliferated in the presence of tumor cells *in vivo*, whereas MSC implanted without tumors did not proliferate. Hence, encouragement of tumor growth by MSC may involve a reciprocal encouragement of MSC growth by the tumor cells (Studeny et al. 2002). Both BM and adipose derived endothelial and mesenchymal progenitor cells have been isolated, cultured and injected back into mice to show that they possess both tumor tropism and tumor promoting capacity (Kidd et al., 2012) (Tab. 3). BM-MSCs have shown to increase the *in vivo* growth of colon cancer, lymphoma and melanoma cells (Klopp et al., 2011). Adult- and fetal-derived MSC were co-injected with colon cancer cells in a murine xenograft model (Zhu et al., 2006), resulting in an increased incidence of tumors with enhanced vascularity and necrosis. Both adult and fetal MSC had similar growth-stimulating effects,

but adult MSC appeared to promote tumor incidence more than fetal MSC. Reflecting an immunosuppressive function, MSC co-administered with B16 melanoma cells prevent the rejection of cancer cells in an allogeneic animal model (Djouad et al., 2003).

Tumor cells injected into nude mice in conjunction with MSC grew faster than those injected without MSC, however, this *in vivo* pro-tumorigenic effect was contrasted by *ex vivo* experiments, where MSC inhibited proliferation of tumor cells through induction of G1 phase arrest (Ramasamy et al., 2007). To explain this discrepancy Ramasamy et al. suggested that MSC may create an artificial niche in which tumor cells preserve their potential to proliferate. Accordingly, MSC niches conferred significant protection to leukemic lymphoblasts against asparaginase-induced cytotoxicity (Iwamoto et al. 2007).

AD-MSc exhibited tumor tropism and were functionally similar to BM-MSc (Dubois et al. 2008). AD-MSc co-transplanted with mammary breast cancers in a syngeneic mouse model promoted the development of larger and more rapidly forming tumors (Muehlberg et al., 2009). Also when hAD-MSc were co-injected subcutaneously with lung cancer or glioma cells into nude mice, the number of viable tumor cells and relative tumor size increased (Yu et al., 2008).

Mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) may suppress tumor growth

Whereas the above studies indicated MSC supported tumor growth, different studies described opposite effects, whereby MSC inhibited tumors (D'Souza et al., 2012). Zipori et al. showed that BM-MSc inhibited sarcoma cells *in vitro* (Zipori et al., 1987), observations later confirmed by demonstration that MSC potently antagonized Kaposi's sarcoma growth *in vivo*. The use of athymic nude mice in the latter experiments suggested that the inhibitory effects of MSC were not necessarily due to immunomodulatory effects (Khakoo et al., 2006). Similar anti-tumor outcomes mediated by MSC were observed in an experimental model of pancreatic carcinoma (Kidd et al., 2010) and in SCID mice with disseminated Non-Hodgkin's lymphoma (NHL). The extensive areas of necrosis within the tumor mass following injection of MSC into the NHL tumor probably reflected an anti-angiogenic effect, since *ex vivo* experiments demonstrated MSC-induced endothelial cell apoptosis (Secchiero et al., 2010).

MSC inhibited the growth of rat colon carcinoma when co-injected with equal number of MSC and tumor cells or with 10-fold more MSC (Ohlsson et al., 2003). Human fetal skin-derived MSC inhibited human liver cancer cell lines, with reduced proliferation, colony formation and oncogene expression both *in vitro* and *in vivo* (Qiao et al., 2008). When these cell lines were co-injected with the same number of MSC, tumor development was delayed and tumor size decreased. The same fetal skin-derived MSC inhibited growth of breast cancer cells *in vitro* (Qiao et al., 2008). The researchers found that treatment with conditioned media resulted in down-regulation of survival factors, such as β -catenin, c-Myc and survivin. This effect was mediated by an inhibitor of β -catenin signaling, Dickkopf-related protein-1 (DKK-1), which was secreted by MSC. The DKK-1 effects were sup-

pressed in MSC with the use of a neutralizing antibody and small interfering RNA, eliminating the growth inhibitory effects of MSC (Qiao et al., 2008). Cousin et al. demonstrated that AD-MSC suppressed pancreatic tumors by altering cell cycle progression. *In vitro* co-culture with AD-MSC increased rates of G1-phase arrest in pancreatic cancer cells and *in vivo* injection of AD-MSC into established pancreatic cancer xenografts further inhibited tumor growth (Cousin et al., 2009). In a similar approach, BM-MSC injected into established subcutaneous melanomas caused apoptosis and abrogation of tumor growth (Otsu et al. 2009). AD-MSC were also found to inhibit proliferation of primary leukemia cells and this effect was mediated by secreted DKK-1 regulated by the stem cell transcription factor NANOG (Zhu et al., 2009).

Modified MSC for more suppression in tumor growth

Given evidence for both an inhibitory and a stimulatory influence of MSC on tumor growth and development one may strategically consider engineering an enhanced inhibitory potential whilst exploiting the MSC qualities of tumor homing and differentiation into TAF. Gene therapy is a promising novel therapeutic strategy for treatment of several heritable and non-heritable human diseases, including infections, degenerative disorders and cancer (Anderson 1992; Matar et al., 2009). MSC have been exploited as delivery vehicles to target antitumor agents to malignant cells. MSC possess several unique properties making them ideally suited for cellular therapies/regenerative medicine and as vehicles for gene and drug delivery. These include:

- relative ease of isolation;
- the ability to differentiate into a wide variety of functional cell types of mesenchymal origin;
- extensively expandable in culture before loss of differentiation potential;
- hypoinmunogenic, they can induce immunosuppression upon transplantation;
- they have pronounced anti-inflammatory properties;
- following systemic administration they can home to damaged tissues, tumors and metastasis (Porada and Almeida-Porada, 2010);
- they are robust cells than can resist hypoxic stress and radiation therapy;
- they can be readily genetically engineered *ex vivo*.

In addition to influencing tumor cells (10), MSC may more broadly influence the tumor microenvironment helping to restore more normal vasculature and tissue homeostasis following tumor regression.

Use of MSC for therapeutic-gene delivery was originally suggested by Matthews and Keating (Matthews and Keating 1996) and Allay et al. (Allay et al., 1997). Initial experiments on virus-mediated transgene expression in MSC showed efficient cell transduction with retroviral vectors expressing lacZ or IL-3 genes, and no changes in differentiation potential of MSC after gene transfer.

Suitable modification of MSC with tailored viral vectors can cause engrafted MSC to steadily release the therapeutic agent, allowing a single administration to result in long-lasting effects. Elzaouk et al. stably transduced MSC with retroviral

vector expressing cytokine IL-12 to inhibit the growth of melanoma (Elzaouk et al., 2006). Ren et al. stably transduced MSC with AAV vector expressing cytokine INF- α to inhibit the growth of melanoma (Ren et al., 2008). An additional approach targeting melanoma, glioma and breast carcinomas relies on the manipulation of MSC to express a pro-drug converting enzyme, such as cytosine deaminase. This enzyme converts 5-fluorocytosine (5-FC) to a soluble toxic molecule that kills both MSC and the neighbouring cancer cells through a bystander effect. (Kucerova et al., 2008). Yong et al. showed that a delivery of the $\Delta 24$ -RGD virus, a tumor selective replication competent adenovirus with specific cellular infectivity to tumors, produced long term survival in an animal model of glioma (Yong et al., 2009). MSC can be also modified to mimic plasma cells producing monoclonal antibodies such as the scFvEGFRv III, which specifically targets mutant EGF receptors on glioma cell surfaces (Balyasnikova et al., 2010). These MSC producing antibodies represent a novel strategy to efficiently deliver therapeutic molecules that would otherwise barely penetrate across the blood brain barrier, thus introducing MSC as efficient therapeutic vehicles for malignant brain tumors.

As widely reported in the literature, TRAIL has a significantly higher therapeutic profile against cancer with virtually no toxicity towards normal tissues, but a short half-life in plasma limits its therapeutic potential. TRAIL signaling pathways are predominantly triggered by death receptors which selectively induce apoptosis in cancer cells without affecting normal cells (Almasan and Ashkenazi 2003). Recently, our laboratory modified AD-MSC with members of the death ligand (DL) family which includes TNF-related apoptosis inducing ligands (TRAIL) as a powerful anti-cancer molecule against cervical carcinoma, pancreatic and colon cancer (Grisendi et al., 2010). Grisendi et al. also investigated the feasibility of associating the AD-MSC TRAIL approach with other therapeutic agents, such as Bortezomib, a well-known proteasome inhibitor. TRAIL refractory tumors were treated *in vitro* in the attempt to sensitize them to our cell therapy approach. The results obtained demonstrated the synergic effect of AD-MSC TRAIL and Bortezomib against a breast cancer tumor cell line, known to be resistant to TRAIL. Using two different animal models, it was demonstrated that AD-MSC producing TRAIL were able to migrate to the tumor microenvironment and persist in tumors without a collateral toxic effect in the surrounding normal tissue. The selective anti-tumor effect was essentially due to cell-to-cell contact between AD-MSC expressing TRAIL and tumor cells, leading to caspase-8 activation within the tumor cells which rapidly activated and induced apoptotic cell death.

As described above, MSC appear to have a dual nature. These intriguing aspects remind the roman Janus Bifrons myth where this divinity had two faces indicating bi-valent functions embedded in one single entity (M. Renard, 1953). A god of motion looking after passages, Janus symbolized the progress from one condition to another and was retained to influence each transitions. Therefore we can suppose that, mesenchymal progenitors and their tumor-related progeny, could intrinsically retain bi-frons, if not pluri-frons, properties which may influence and being influenced by microenvironmental cues specific for each of neoplastic conditions. Reacting to discrete stimula, MSC can change their machineries

influencing the transition from pre-tumorigenic condition to neoplasia or, vice-versa, control dis-proliferative conditions arresting tumor growth. Following up this hypothesis, it may also be that MSC become either pro-tumorigenic or anti-tumorigenic reacting to specific tumor cell types or after contact with their micro-environment. Nonetheless, beyond experimental considerations, clinical studies on cancer patients provide some conflicting data about the effect mediated by MSC on cancer progression. Independent reports indicated that MSC do not affect the progression of breast and hematological malignancies (Koc et al. 2000; Lazarus et al., 2005). In contrast, a single cohort inpatients suffering from hematological malignancies who were treated with chemotherapy and then co-transplanted with MSC and hematopoietic stem cells (HSC) showed greater incidence of disease relapse compared to those who received HSC alone (Ning et al. 2008). In spite of these data, in larger cohorts more than 200 patients were treated by MSC for different regenerative medicine applications (Centeno et al., 2010) and no increased risks of neoplasia have been reported. Still we cannot deny this possible side effect of MSC and, more, this property should be pre-clinically investigated considering MSC as novel tools of drug discovery in cancer.

This work has been supported in parts by: Ministero Italiano Istruzione Università e Ricerca-PRIN 2008 (MD, PP), Ministero Italiano della Salute-Bando Giovani Ricercatori (MD), Regione Emilia Romagna (PP, MD), the Associazione ASEOP (PP, MD), and Fondazione Cassa di Risparmio di Modena (MD).

Extracellular matrix-dependent regulation of normal and pathological stem cell function

Vittorio Abbonante¹, Alessandra Balduini^{1,2}

¹Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Pavia

²Department of Biomedical Engineering, Tufts University, Boston, USA

Extracellular matrix (ECM) is composed by five classes of macromolecules: collagen, elastin, proteoglycans, hyaluronan and adhesive glycoproteins. ECM in different tissues exerts particular functions which vary as tendons, blood vessel walls, cartilage, bone, subcutaneous fat and many others (Pollard et al., 2008).

The collagen family is the most abundant class of proteins in the human body. It is also one of the most versatile. The collagen family is very diverse. Humans have about 100 genes with collagen triple repeats, and more than 20 specialized collagen proteins have been characterized. The main characteristic of collagens is that they form fibrils or other assemblies in the extracellular matrix. Collagen fibrils provide tensile strength to tendons, ligaments, bones, and dense connective tissue. A second group of collagens polymerizes into sheets rather than fibrils. As an example, basement membrane is a specialized ECM, which is produced by epithelial, endothelial, and stromal cells to separate epithelium or endothelium from stroma.

Proteoglycans are protein-polysaccharide complexes in which the glucidic moieties are long polysaccharide chains, made up of repeating disaccharide units, covalently linked to a protein core. Given their physical properties and distribution among the fibrous elements of the extracellular matrix, proteoglycans and hyaluronan are thought to be elastic space-fillers. Beside these mechanical functions, proteoglycans influence cellular behavior such as adhesion or motility and modulate embryonic development and wound healing.

Collagen and proteoglycans, together with the other components of the ECM, confer unique physical, biochemical, and biomechanical properties that are essential for regulating cell behavior.

For example, the physical properties of the ECM refer to its rigidity, porosity, insolubility, spatial arrangement and topography, and other physical features that together determine its role in scaffolding to support tissue architecture and integrity. Additionally, the ECM's physical properties regulate cell migration. A number of signaling pathways have been described related to the transduction of mechanical signals into biochemical responses to regulate cell behavior (Chen et al., 2008).

Moreover changes in mechanical properties are pervasive in vivo during tissue development and wound healing, as well as during pathological processes such as fibrosis or tumorigenesis (Davidson et al., 1999). In contrast, the biochemical properties of the ECM pertain to its indirect and direct signaling capabilities that allow cells to sense and interact with their environments using various signal transduction cascades.

Finally, one of the most important characteristic of cell-ECM interactions is that they are reciprocal. On one hand, cells are constantly creating, breaking down, or rearranging ECM components. On the other hand, because the ECM regulates cell behavior, any changes in the ECM as a result of cellular activities will in turn impact cells behaviors (Butcher et al., 2009).

Extracellular matrix and cancer

The local microenvironment, or niche, of a cancer cell plays important roles in cancer development. ECM is a major component of the niche, a complex network of macromolecules with distinctive physical, biochemical, and biomechanical properties. Although tightly controlled during embryonic development and organ homeostasis, the ECM is commonly deregulated and becomes disorganized in diseases such as cancer. Abnormal ECM affects cancer progression by directly promoting cellular transformation and metastasis. Importantly, ECM anomalies also deregulate behavior of stromal cells, facilitate tumor-associated angiogenesis and inflammation, and thus lead to generation of a tumorigenic microenvironment. Abnormal ECM dynamics are one of the most important clinical outcomes in diseases such as tissue fibrosis and cancer (Cox and Erler, 2011).

Excess ECM production or reduced ECM turnover are prominent in tissue fibrosis of many organs (Frantz et al., 2010) and various collagens, including collagen I, II, III, V, and IX, show increased deposition during tumor formation (Lu P 2012). Moreover, many other ECM components and their receptors such as heparan sulfate proteoglycans and CD44 that facilitate growth factor signaling are frequently overproduced in cancer (Lu P 2012).

Thus, abnormal changes in the amount and composition of the ECM can greatly alter ECM biochemical properties, potentiate the oncogenic effects of various growth factor signaling pathways, and deregulate cell behaviors during malignant transformation. Furthermore, ECM's biomechanical properties also change under disease conditions.

Part of the increase in ECM stiffness depend on the increase of activities of lysyl oxidase (LOX), which crosslinks collagen fibers and other ECM components. Mounting evidence suggests that the ECM is an essential noncellular component of the adult stem cell niche. For example, various ECM receptors have been used as markers to enrich adult stem cells in many in vitro and in vivo systems (Shen et al., 2008; Raymond et al., 2009), suggesting that contact with the ECM is necessary for cells to acquire or maintain stem cell properties. Importantly, the imbalance of stem cell expansion and differentiation can lead to the generation of tumorinitiating cells, which have been called cancer stem cells.

Anoikis

Integrins regulate cell viability through their interaction with the ECM, sensing mechanical forces ensuing from contacts and converting them into intracellular signals, thus determining if a cell is in the correct location. Anoikis is a form of programmed cell-death induced by inadequate or inappropriate cell/ECM attachment. This kind of cell death is important for development, tissue omeostasis and several disease. Not all cell types are equally sensitive to anoikis. Epithelial and endothelial cells were found to be more sensitive than fibroblast and mesenchymal stem cells (Gilmore. 2005; Thompson et al., 2005), further non adherent cells, such as haematopoietic mature cells and leukocytes have phisiological protection from anoikis (Giannoni et al., 2008). The loss of the fine control is responsible of the decrease of the cell defences against transformation, facilitating cancer cells dissemination and metastases. Pathologic cells can avoid anoikis through different strategies comprehending the ligand-independent activation of growth factor receptors, or the change of the pattern of integrin expression (Breuss et al., 1995; Regezi et al., 2002). Further through autocrine growth factor loop or paracrine stimulation by neighbouring cells, they can activate pro-survival pathways. Hy-

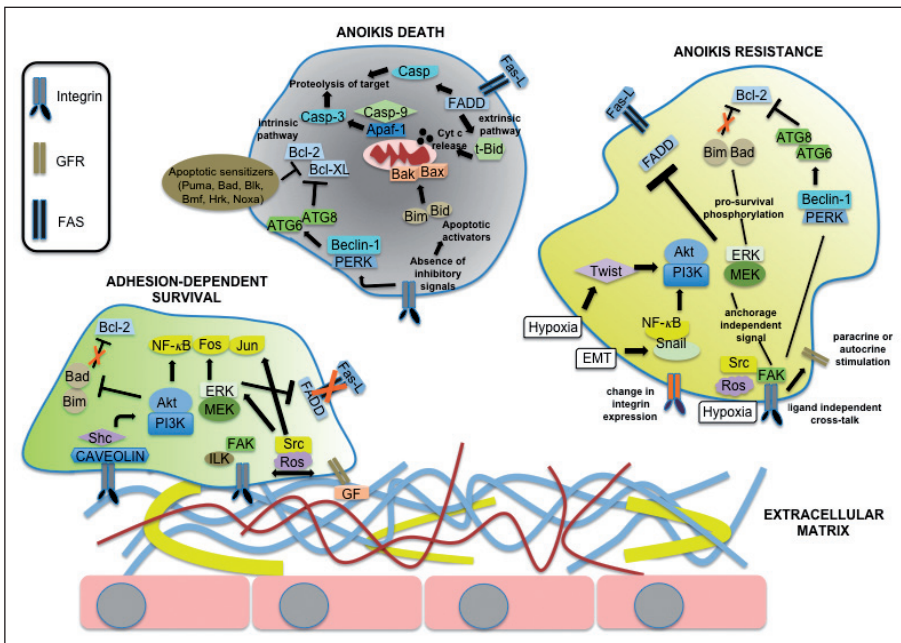


Fig. 1 - Adhesion dependent survival. Integrin engagement by ECM, triggers pro-survival pathways through key players such as FAK, ILK, Src, PI3K, ERK, Shc leading to the transcription of NF- κ B, Fos, Jun. Growth factors (GF) collaborate with integrin in promoting cell survival. *Anoikis death.* Lack of ECM contact or engagement with inappropriate ECM fails to sustain pro-survival signals thus activating anoikis from death receptor (FAS) and mitochondria. *Anoikis resistance.* Cancer stem cells or anoikis resistant cells have developed strategies to prevent anoikis through the activation of survival signals and the inhibition of death pathways.

poxya and consequent ROS production can also participate in anoikis resistance by activation of transcription factors and by down regulating pro-apoptotic factors (Bcl-2) (Chiarugi. 2008). Finally, a mechanisms of evading anoikis has been revealed recently in murine lung carcinoma cells, able to overexpress type IV collagen. Thus, constitutive integrin activation results in an advantage in their liver-metastatizing potential.

An example of niche environment: bone marrow and hematopoiesis

The Bone Marrow (BM) is highly complex, and conventional representations of BM hematopoiesis often reference an “endosteal” niche, which is populated by osteoblasts (OSTs), and a “vascular niche”, which is an anatomically distinct perivascular space (Oh and Kwon; 2010). Despite its fundamental role in regulating hematopoiesis, analysis of the BM microenvironment *in vivo* has been hampered because of the diffuse three-dimensional nature of its structure and technical limitations. As a consequence, the precise location of specific ECMs hence their possible regulatory influences on populations of hemopoietic stem cells (HSCs) remains poorly understood. The few data that are available demonstrate that fibronectin, collagen types I, III and IV, laminin and proteoglycans, are present in different locations in BM (Nilsson et al., 1998). Recently, we have analyzed spatial distribution of different ECMs in mice BM, demonstrating that endosteum contains fibronectin and type I collagen, while, BM sinusoids are enriched in

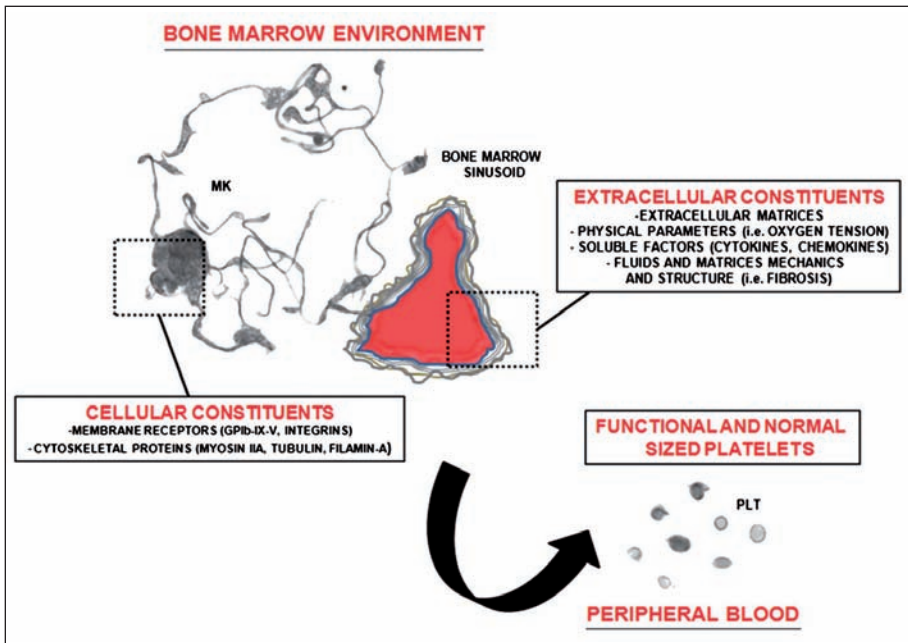


Fig. 2 - Megakaryocyte development is regulated by the bone marrow environment, membrane receptors and cytoskeleton activation.

collagen type I, IV, laminin and fibronectin (Malara et al., 2011a; 2011b). Distinct distributions of ECM proteins suggest that HSC function is subsequent to a synchronized signaling from different ECMs that is required for a spatial and temporal regulation to ensure correct release of mature cells into the bloodstream. Among the diseases, myeloproliferative neoplasms (MPNs), which include primary myelofibrosis (PMF), represent one of the most severe clinical picture that is still incurable. In this case megakaryocytes, the progenitor of platelets, present several abnormalities and are considered the trigger of the fibrosis although the exact mechanisms are still unknown (Ciurea et al., 2007; Balduini et al., 2011). A summary of the main variables that may impact megakaryocyte development is reported in Figure 2 (Malara et al., 2012).

References

1. Balduini A, Badalucco S, Pugliano MT, Baev D, De Silvestri A, Cattaneo M, et al. In vitro megakaryocyte differentiation and proplatelet formation in Ph-negative classical myeloproliferative neoplasms: distinct patterns in the different clinical phenotypes. *PLoS One*. 2011; 6: e21015.
2. Breuss JM, Gallo J, DeLisser HM, Klimanskaya IV, Folkesson HG, Pittel JF, et al. Expression of the $\beta 6$ integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *J Cell Sci*. 1995; 108: 2241-2251.
3. Butcher DT, Alliston T, Weaver VM. A tense situation: Forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2009. 9: 108-122.
4. Chen S. Adhesive models to understand the sensitivity of bio-molecules to environmental signals. *Mol Cell Biomech*. 2008; 5: 97-106.
5. Chiarugi P, Giannoni E. Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem Pharmacol*. 2008; 76: 1352-1364.
6. Ciurea SO, Merchant D, Mahmud N, Ishii T, Zhao Y, Hu W, et al. Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2007; 110: 986-993.
7. Cox TR, Ertler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: Implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech*. 2011; 4: 165-178.
8. Davidson LA, Oster GF, Keller RE, Koehl MA. Measurements of mechanical properties of the blastula wall reveal which hypothesized mechanisms of primary invagination are physically plausible in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol*. 1999; 209: 221-238.
9. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*. 2010; 123: 4195-4200.
10. Gilmore AP. Anoikis. *Cell Death Differ*. 2005; (Suppl. 2): 1473-1477.
11. Giannoni E, Buricchi F, Grimaldi G, et al. Redox regulation of anoikis: reactive oxygen species as essential mediators of cell survival. *Cell Death Differ*. 2008; 15: 867-878.
12. Malara A, Gruppi C, Pallotta I, Spedden E, Tenni R, Raspanti M, et al. Extra-

- cellular matrix structure and nano-mechanics determine megakaryocyte function. *Blood*. 2011; 118: 4449-4453.
13. Malara A, Gruppi C, Rebuzzini P, Visai L, Perotti C, Moratti R, et al. Megakaryocyte-matrix interaction within bone marrow: new roles for fibronectin and factor XIII-A. *Blood*. 2011; 117: 2476-2483.
 14. Malara A, Balduini A. Blood platelet production and morphology. *Thromb Res*. 2012; 129: 241-244.
 15. Nilsson SK, Debatis ME, Dooner MS, Madri JA, Quesenberry PJ, Becker PS. Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. *J Histochem Cytochem*. 1998; 46: 371-377.
 16. Oh IH, Kwon KR. Concise review: multiple niches for hematopoietic stem cell regulations. *Stem Cells*. 2010; 28: 1243-1249.
 17. Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz. *Cell Biology*. 2008; Elsevier Inc.
 18. Raymond K, Deugnier MA, Faraldo MM, Glukhova MA. Adhesion within the stem cell niches. *Curr Opin Cell Biol*. 2009; 21: 623-629.
 19. Regezi JA, Ramos DM, Pytela R, et al. Tenascin and $\beta 6$ integrin are overexpressed in floor of mouth in situ carcinomas and invasive squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2002; 38: 332-336.
 20. Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, Roysam B, Temple S. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell*. 2008; 3: 289-300.

**IL RUOLO DEL MICROAMBIENTE
NELLE EMOPATIE MALIGNI**

Il ruolo del microambiente nella leucemogenesi e nella progressione delle LAM

Paolo Bernasconi, Marina Boni, Paola Maria Cavigliano, Irene Dambruoso, Barbara Rocca, Rita Zappatore, Celeste Calvello, Iliaria Giardini, Antonella Orlando, Marilena Caresana, Angela Pasi, Mirko Farina, Valeria Fiaccadori, Francesco Ripamonti

Divisione di Ematologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Università di Pavia

Nel 1997 Bonnet e Dick hanno dimostrato che l'ematopoiesi leucemica, come quella normale, è organizzata in modo gerarchico: solo poche cellule, dette cellule staminali leucemiche (LCS), sono clonogeniche, capaci cioè di generare leucemia se trapiantate in modelli sperimentali murini. Successivamente, l'analisi cromosomica, la citogenetica molecolare, le metodiche molecolari e le tecnologie "high-throughput", che oggi sono a nostra disposizione, hanno consentito una sempre più precisa categorizzazione molecolare della popolazione leucemica con conseguente identificazione delle caratteristiche funzionali più tipiche di tale popolazione cellulare ed il conseguente sviluppo di terapie sempre più efficaci perché capaci di colpire il difetto molecolare responsabile della malattia. Questo approccio metodologico non ha però considerato il ruolo svolto dal microambiente midollare. Nel 1978 Schofield era stato il primo a suggerire l'esistenza di un microambiente midollare, la cosiddetta nicchia ematopoietica, capace di accogliere la cellula staminale ematopoietica (CSE) normale. Successivamente, vari studi avevano confermato la reale esistenza di tale struttura anatomica che è costituita da osteoblasti, osteoclasti, cellule endoteliali, cellule reticolari perivascolari, cellule mesenchimali che producono citokine, chemokine e segnali intracellulari assolutamente necessari per una normale omeostasi midollare. La dimostrazione che un alterato funzionamento di questi segnali possa essere responsabile della trasformazione neoplastica della CSE è supportata da recenti evidenze sperimentali, da recidive leucemiche dopo trapianto allogenico causate dalla trasformazione leucemica dei progenitori ematopoietici del donatore sano (Wiseman, 2011) e da possibili rigetti di cellule leucemiche umane trapiantate in topi non competenti dal punto di vista immunologico (Kerbaui et al., 2004).

In questa breve trattazione verrà inizialmente analizzata la funzione di supporto che il microambiente midollare svolge nei confronti della CSE e la competizione esistente tra CSE e CSL per occupare tale struttura. Successivamente, verrà esaminata la capacità della CSL di modificare la nicchia ematopoietica, la capacità di

quest'ultima di proteggere la CSL dagli effetti tossici della chemio-radioterapia, la capacità della nicchia di promuovere il processo di leucemogenesi grazie a lesioni geniche intrinseche.

La nicchia ematopoietica nell'ematopoiesi normale

Nel 1978 Schofield definì la nicchia ematopoietica come una ben precisa sede anatomica; uno spazio limitato che contiene un numero limitato di CSE che si auto-mantengono, si riproducono ma non si differenziano; uno spazio in cui è possibile ad una cellula dotata di un certo grado di maturazione di tornare al fenotipo della cellula staminale. Negli anni seguenti queste caratteristiche della nicchia ematopoietica vennero confermate e progressi nella genetica del topo e nella microcopia identificarono due tipi di microambiente: la nicchia endostale e la nicchia vascolare. La prima, situata nelle vicinanze della superficie endostale dell'osso trabecolare e ricca di osteoblasti, è il microambiente che ospita CSE quiescenti o poco proliferanti (long-term CSE), mentre la nicchia vascolare, costituita da cellule endoteliali che formano la parete di vasi sanguigni, è il microambiente che ospita CSE in attiva proliferazione e differenziazione (short-term CSE). Dati recenti indicano che tra queste due nicchie non vi è una netta distinzione bensì una stretta cooperazione, come viene dimostrato dal fatto che dopo danni midollari l'endostio forma una struttura riccamente vascolarizzata nelle vicinanze di progenitori osteoblastici N-caderina positivi.

La cellula staminale mesenchimale (CSM) CXCL12 e CD146 positiva occupa una posizione di primo piano all'interno del microambiente midollare. Infatti, la CSM è situata sulla superficie sinusoidale alla cui formazione partecipa, produce angiopoietina-1 e genera osteoblasti che formano la nicchia endostale. Le CSM consentono alla CSE di passare dalla nicchia endostale alla nicchia vascolare e producono citokine e chemokine che in certe nicchie raggiungono una particolare concentrazione anche determinata dai livelli di glicosamminoglicani. Tra queste citochine/chemokine bisogna ricordare l'asse CXCL12-CXCR4 che controlla l'accasamento delle CSE ed il ligando di Flt3 che insieme all'angiopoietina-1 regola la quiescenza della CSE. La matrice extracellulare prodotta dalle CSM ha un ruolo molto importante nella normale omeostasi midollare perché consente e media le interazioni tra i vari tipi cellulari. A questo proposito la "Vascular Adhesion Molecule-1" (VCAM-1) regola l'adesione alla CSM.

CSL e CSE: in competizione per la nicchia ematopoietica

La capacità delle CSL di occupare e competere con le CSE normali per la nicchia ematopoietica è stata dimostrata da xenotrapianti di cellule leucemiche umane in modelli murini. Nel 2007 Ninomiya et al. aveva eseguito xenotrapianti di CSL e di cellule CD34 positive da cordone ombelicale in modelli murini ed aveva analizzato l'"homing", la proliferazione e la sopravvivenza di questi due tipi di cellule. Inizialmente le cellule leucemiche si localizzavano nelle vicinanze degli osteoblasti della regione epifisaria e successivamente raggiungevano le regioni vasco-

larizzate più profonde della diafisi; dopo circa otto settimane il loro di cellule leucemiche giungeva transitoriamente al 50% soprattutto grazie all'espansione della frazione epifisaria. Il trattamento con citosina arabinoside faceva sì che le cellule leucemiche si disponessero in clusters ed aderissero ad osteoblasti ed endotelio che ne rendevano possibile la sopravvivenza forse grazie a segnali anti-apoptotici. Un altro studio aveva dimostrato che cellule leucemiche umane trapiantate in topi neonati NOD/SCID/IL2 γ ^{null} con mutazione completa "null" della citochina γ c si accasavano nell'endostio dove erano protette dall'apoptosi indotta dalla chemioterapia (Ishikawa et al., 2007). Questa protezione poteva essere però determinata anche dall'attivazione di p21, un inibitore del ciclo cellulare necessario all'auto-mantenimento della popolazione neoplastica. In condizioni fisiologiche l'attivazione di p21 è regolata dalla via di segnale presieduta da Wingless (Wnt), un potente morfogeno che promuove l'espansione ed il mantenimento della CSE. Nel topo se la CSE esprime oncogeni leucemia-associati si sviluppano danni nel DNA che causano l'attivazione di p21 con conseguente blocco del ciclo cellulare e promozione del riparo del DNA (Viale et al., 2009).

Più recentemente, l'impiego di un modello retrovirale singenico di LAM MLL-AF9 ha permesso di individuare due diversi stadi di progressione di questo tipo di leucemia (Lane et al., 2011). Questo studio, che ha confrontato l'accasamento di cellule staminali pre-leucemiche (pre-CSL) con quello di CSE normali e l'accasamento di CSL con quello di CSE, ha dimostrato che l'accasamento della pre-CSL, come quello della CSE, era governato da Wnt, mentre l'accasamento della CSL era sovrapponibile a quello dei normali progenitori mieloidi. La presenza della proteina Dickkopf-1 (Dkk1), un potente inibitore di Wnt, impediva l'accasamento della CSE ma non quello delle pre-CSL, delle CSL e lo sviluppo della LAM. L'attivazione della via di segnale presieduta da Wnt era intrinseca alla cellula leucemica ed indipendente dal microambiente. Questo studio, il primo ad impiegare un trapianto singenico in modelli murini, ha modificato il concetto secondo cui le CSL si accasano ed alloggiano selettivamente nell'endostio e ha suggerito che invece possano esservi particolari zone del microambiente che ne favoriscono la crescita. Lane et al. (2011) ha inoltre indicato che le CSL isolate da una franca LAM contengono un alto numero di cellule clonogeniche (\approx 1:4-6) e che le CSL localizzate nelle vicinanze di osteoblasti Dkk1 positivi possiedono una maggiore influenza sulle CSE rispetto alle CSL localizzate nelle vicinanze di osteoblasti "wild-type". Queste osservazioni potrebbero far ritenere che la nicchia creata dalla CSL non sia effettivamente in grado di supportare la normale ematopoiesi, ma potrebbe causare quella soppressione dell'ematopoiesi che spesso si osserva durante il decorso di una LAM anche in pazienti con una modesta massa leucemica. A supporto di questa possibilità sta il fatto che nel 2008 Colmone et al. (2008) aveva osservato che inizialmente cellule di leucemia umana trapiantate nel topo migravano verso la nicchia vascolare, nicchia endostale nel topo (Sipkins et al., 2005), guidate dall'asse CXCR4-CXCL12 (SDF-1). Tuttavia, dopo circa un mese la produzione di CXCL12 nel midollo osseo si riduceva drasticamente e le cellule CD34 positive umane normali migravano verso la nicchia tumorale non più guidate dai livelli di CXCL12 bensì dai livelli di "stem cell factor" (SCF)

prodotto in gran quantità dalle cellule leucemiche. Tian et al. (2013) ha però recentemente smentito questa osservazione dimostrando che i livelli di SCF nel sangue periferico e nel midollo osseo di un modello murino di leucemia acuta linfoblastica a cellule T erano effettivamente molto elevati, ma era la popolazione ematopoietica normale a presentare i più alti livelli di RNA messaggero per SCF e proteina SCF e non quella leucemica. Pertanto, era la popolazione normale che in risposta alla noxa leucemica aumentava la produzione di SCF. Inoltre, il gene *Hes1*, che codifica per la proteina “helix-loop-helix” “hairy and enhancer of split (HES) 1” della *Drosophila* ed il suo bersaglio p21 erano sovra-espressi dalle cellule staminali normali, ma normo-espressi dai progenitori ematopoietici normali. Questa diversa espressione e lo stato di quiescenza garantivano la sopravvivenza delle cellule staminali normali e spiegavano invece il progressivo esaurimento dei progenitori ematopoietici quando queste due popolazioni cellulari venivano trapiantate insieme a cellule di leucemia acuta linfoblastica T in modelli murini (Hu et al., 2009). Pertanto cellule staminali ematopoietiche e progenitori ematopoietici normali rispondevano diversamente al microambiente leucemico e la sovra-espressione di *Hes1* garantiva la sopravvivenza delle prime e l’esaurimento dei progenitori ematopoietici.

La rilevanza di particolare aree del microambiente per l’accasamento di CSL è stata ulteriormente rimarcata dall’osservazione che nella LA linfoblastica una particolare alterazione della struttura epatica poteva in realtà sottendere l’esistenza di una nicchia leucemica (Kato et al., 2011). Infatti, nei topi NOD/SCID/Yc (null) sottoposti a xenotrapianto di cellule di leucemia acuta linfoblastica umana le cellule epiteliali del dotto biliare potevano formare una nicchia, mantenuta dall’asse SDF1-CXCR4, che supportava l’infiltrazione e la proliferazione delle cellule leucemiche umane.

Oltre a consentire l’accasamento della CSL la nicchia ematopoietica potrebbe permettere che cellule giunte ad un determinato livello di maturazione riacquistino la clonogenicità, cioè la capacità di generare leucemia tipica della cellula staminale leucemica, o vengano indotte a differenziarsi verso una particolare linea cellulare. Sino ad ora non vi sono prove che il microambiente possa effettivamente influire sulla clonogenicità della cellula leucemica. Tuttavia, nel 2006 Krivtsov et al. aveva dimostrato che l’introduzione della proteina MLL-AF9 in progenitori granulocito-macrofagici consentiva di ottenere CSL per riattivazione di una “signature” di “self-renewal” specifica della leucemia e senza che fosse necessaria una riprogrammazione del profilo di espressione genica. Più recentemente è stato osservato che le stesse proteine di fusione possono generare una LAM a partenza dalla cellula staminale o da un progenitore granulocitico-macrofagico (Krivtsov et al., 2012). Cellule staminali leucemiche derivate da ciascuno dei due progenitori presentano analoghe caratteristiche immunofenotipiche, ma diversa espressione genica, profilo epigenetico e risposta alla terapia. In uno studio precedente lo xenotrapianto di cellule leucemiche umane con trascritto MLL-AF9 in modelli murini con deficit immunitari non solo aveva dimostrato un’eterogeneità della popolazione leucemica, costituita da cellule multipotenti e cellule già commessionate, ma anche l’importanza di segnali provenienti dal microambiente midollare

nell'indurre la differenziazione di cellule multipotenti verso una determinata linea cellulare. Infatti, la differenziazione della cellula leucemica multipotente era determinata dalla razza di topo o dal fattore di crescita impiegati e non tanto dal partner di MLL nella proteina di fusione (Wei et al., 2008). Un altro studio ha dimostrato che segnali purinergici inibiscono la proliferazione, la migrazione e l'attecchimento di cellule di leucemia acuta umana in modelli murini (Salvestrini et al., 2012). Ancora più recentemente è stato osservato che nella leucemia MN1 positiva segnali provenienti dal microambiente midollare possono modificare il fenotipo della cellula leucemica facendolo virare da mieloide ad eritroide (Heuser et al., 2012).

Alterazioni della nicchia indotte dalla CSL

La CSL può modificare le proprie interazioni con la nicchia ematopoietica producendo esosomi, DNA, citochine e chemochine, e modificando l'espressione dei propri antigeni di membrana. È stato recentemente osservato che cellule leucemiche fresche e linee cellulari leucemiche producono vescicole di dimensioni diverse: gli esosomi hanno un diametro di 30-100 nm mentre le microvescicole di 100-1000 nm. Entrambi derivano dalla membrana cellulare, contengono RNA messaggero, miRNA e proteine che vengono riversati nel citoplasma delle cellule stromali adiacenti creando una stretta comunicazione intercellulare che prescinde dal controllo trascrizionale (Huan et al., 2013). Ad esempio il traffico di recettori mediato dalle vescicole può trascendere i normali segnali prodotti dalla nicchia, di solito basati sull'espressione di ligandi o recettori specifici di un determinato tipo cellulare, e modulare segnali prodotti dai diversi fattori di crescita. Gli esosomi delle cellule di LAM contengono RNA messaggero che codifica per trascritti importanti per la prognosi (FLT3-ITD, NPM1) e per la terapia (FLT3-ITD, IGF-IR, CXCR4) della malattia e trascritti importanti per le funzioni della nicchia (IGF-IR, CXCR4, MMP9). In questo modo le cellule leucemiche alterano l'espressione genica, la produzione di proteine, il comportamento delle cellule stromali vicine. Le cellule leucemiche possono però anche distruggere il microambiente midollare ed uccidere le cellule stromali producendo complessi simili al nucleosoma per frammentazione del loro DNA genomico (Dvořáková et al., 2013). Questo avviene perché le lesioni geniche presenti nella cellula leucemica inducono uno stato d'instabilità genica determinato dall'inefficiente funzionamento dei meccanismi di arresto del ciclo cellulare e di riparo del DNA. I complessi simili al nucleosoma prodotti dalla cellula leucemica passano nel citoplasma delle cellule stromali vicine, fosforilano la serina 139 dell'istone H2A.X e si integrano nel DNA della cellula ospite. Questo processo, la cui gravità è direttamente proporzionale alla quantità di DNA frammentato, fa sì che la cellula stromale attivi i meccanismi di riparo del DNA e sviluppi di uno stato d'instabilità genica. Questa situazione da un lato determina la morte della cellula stromale e dall'altro consente alle cellule leucemiche di passare nel torrente circolatorio. Un ruolo molto importante in questo processo viene svolto dalla regione "leucine zipper" (LPR) del gene Myb, che codifica per un fattore trascrizionale. Infatti, solo le cellule leucemiche con LPR

in forma “wild-type” si riversano nei capillari midollari, quelle che presentano la mutazione ΔP non passano nel torrente circolatorio.

Tra le citokine prodotte dalle cellule leucemiche in grado di alterare le interazioni con la nicchia ematopoietica un ruolo molto importante spetta alle metalloproteinasi (MMPs), alle angiopoietine 1 e 2, al “basic fibroblast growth factor” (bFGF), al “vascular endothelial growth factor-A” (VEGF-A) ed al “Platelet derived growth factor” (PDGF). Le MMPs sono endopeptidasi zinco dipendenti capaci di degradare la matrice extracellulare. Nella nicchia ematopoietica normale la loro attivazione consente la liberazione della forma solubile del ligando di c-Kit ed il passaggio delle CSE e delle cellule endoteliali dalla nicchia endostale a quella vascolare (Heissig et al., 2002). Nelle LAM, specie quelle a citotipo mielomonocitico e monocitico, la MMP2 e la MMP9 consentono la migrazione verso e l’invasione di tessuti extramidollari (Paupert et al., 2008). Per questo motivo alti livelli di MMP2 e 9 hanno un impatto prognostico sfavorevole. Nelle LAL a cellule B le due MMPs rompono ed aumentano la permeabilità della barriera emato-encefalica con conseguente interessamento del sistema nervoso centrale (Feng et al., 2011). Per quanto riguarda le angiopoietine 1 e 2 il loro livello è aumentato nelle LAM che presentano la mutazione di NPM1 ed un gran numero di cellule stromali. L’ang-1 attiva la tirosina chinasi Tie2 ed il complesso così formato attiva a sua volta la via di segnale PI3K/Akt e di MAPk/ERK promuovendo la sopravvivenza non solo della cellula leucemica ma anche della cellula endoteliale (Hatfield et al., 2008). Uno studio recente ha dimostrato che nelle LAM che sovra-esprimono il gene EVI1 la via di segnale Ang/Tie2 mantiene la cellula nella fase G0/G1 del ciclo cellulare grazie all’aumentata espressione di p18 (INK4), un inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti (Ichihara et al., 2011). Per questo motivo le cellule leucemiche con alti livelli di espressione di Evi1 sono quiescenti e quindi resistenti alla terapia. L’ang-2 funziona da antagonista naturale di ang-1 ed un suo significativo aumento si associa ad una prognosi sfavorevole. Per quanto concerne il bFGF, il VEGF-A ed il PDGF, il ruolo pro-angiogenico del primo è ancora poco chiaro, mentre è ormai noto che gli altri due favoriscono la migrazione della cellula leucemica e l’angiogenesi. Dal punto di vista clinico solo la concentrazione di VEGF-A ha un impatto prognostico rilevante: un’alta concentrazione determina una breve sopravvivenza e ad un alto rischio di recidiva leucemica (Ayala et al., 2009). Il VEGF-A agisce con meccanismo autocrino e paracrino, si lega ai recettori 1 e 2 presenti sulle cellule endoteliali e determina una disorganizzazione ed un aumento della permeabilità vascolare (Doan et al., 2011). Il PDGF si lega al proprio recettore presente sulla membrana dei periciti e delle cellule muscolari lisce della parete vasale e promuove la produzione di RNA messaggero che codifica per l’eritropoietina. Quest’ultima promuove l’angiogenesi con un meccanismo sia paracrino (stimola la proliferazione delle cellule endoteliali) che endocrino (stimola l’emopoiesi extramidollare con aumento della perfusione di ossigeno e protezione dall’anemia indotta dalla malattia), induce la formazione di nuovi vasi ed il rimodellamento vascolare (Xue et al., 2012). Nonostante queste nuove conoscenze, i meccanismi pro-angiogenici attivati dalle cellule leucemiche sono tuttora mal definiti. Recentemente, è stata prospettata una stretta interazione tra il

network di queste citokine e quello delle MMPs visto che entrambi hanno come regolatore trascrizionale il nuclear factor kappa-B (NF- κ B) (Hatfield et al., 2010). Anche variazioni dell'espressione di molecole di adesione presenti sulla superficie della cellula leucemica possono modificare le interazioni tra questa ed il microambiente midollare circostante favorendo la persistenza di un'eventuale malattia minima residua. A questo proposito un ruolo fondamentale viene svolto dall'interazione tra CXCR4, espresso dalla cellula leucemica, ed il CXCL12 (SDF-1), prodotto dalle cellule stromali. Alti livelli di CXCR4 si osservano specialmente nelle LAM con "Internal Tandem Duplication" del gene FLT3 e determinano una prognosi sfavorevole (Rombouts et al., 2004). Questo dato suggerisce che proprio grazie a CXCR4 Flt3 possa partecipare alla migrazione delle cellule leucemiche. Il trattamento di topi NOD/SCID sottoposti a xenotrapianti di cellule leucemiche umane con AMD3100, un inibitore di CXCL12/CXCR4 riduceva significativamente la quota di cellule leucemiche presenti nel sangue periferico, nella milza e nel midollo osseo ma non influiva sull'accasamento di progenitori ematopoietici normali (Tavor et al., 2004). In un altro modello murino sottoposto a xenotrapianto di cellule umane di leucemia acuta promielocitica lo stesso inibitore in combinazione con la chemioterapia faceva aumentare il numero di cellule leucemiche presenti nel sangue periferico e determinava una sopravvivenza più lunga di quella garantita dalla sola chemioterapia (Nervi et al., 2009). Un altro studio aveva dimostrato che l'inibizione di CXCR4 aumentava la sensibilità di blasti leucemici Flt3 ITD positivi coltivati in vitro insieme a cellule stromali al sorafenib, un inibitore di Flt3. Inoltre, fatto ancor più rilevante, in modelli murini la somministrazione di AMD3465 senza o con fattore di crescita granulocitario causava la mobilizzazione delle cellule leucemiche e dei progenitori emopoietici nel sangue periferico allungando la sopravvivenza degli animali trattati con sorafenib (Zeng et al., 2009). Questa osservazione indicava che l'asse CXCL12/CXCR4 era necessario per l'accasamento delle cellule leucemiche e per la loro protezione dagli effetti tossici della chemioterapia. Altre importanti molecole di adesione sono il "Very-Late Antigen-4" (VLA-4), il CD44, il CD45, le integrine e la catena α del recettore per l'interleukina 3. Il VLA-4 è indispensabile per il legame alla fibronectina espressa dalle cellule mesenchimali e facilita la persistenza di un'eventuale MMR. Alti livelli di VLA-4 si correlano con un alta percentuale di blasti midollari. È stato osservato che l'associazione anticorpo monoclonale anti VLA4 e citosina arabinoside impediva lo sviluppo di una leucemia acuta in topi SCID sottoposti a xenotrapianto (Matsunaga et al., 2003). Il CD44 è un'altra molecola di adesione che determina l'accasamento della cellula leucemica legandosi allo ialurano, un glicosamminoglicano presente in alte concentrazioni nella nicchia endostale, all'osteopontina, alla fibronectina ed alla E-selectina. Il CD44 partecipa alle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare, trasduce molti segnali intracellulari lungo le vie di trasduzione del segnale o particolari funzioni attivate da anticorpi monoclonali. In tal modo determina una resistenza all'apoptosi, l'invasività della popolazione neoplastica, la mobilizzazione delle cellule leucemiche nel sangue periferico ed una prognosi sfavorevole. L'importanza clinica del CD44 è stata dimostrata da uno studio condotto in modelli murini

NOD/SCID nei quali il trattamento con un anticorpo monoclonale anti-CD44 riduceva significativamente l'attecchimento delle cellule leucemiche umane e della CSL vista la bassa incidenza di leucemia acuta dopo un secondo trapianto (Jin et al., 2006). La fosfatasi CD45 regola la migrazione dei progenitori emopoietici e delle cellule leucemiche. Un recente studio ha dimostrato che il trattamento con un anticorpo monoclonale anti-CD45 determinava un'aumentata adesione di entrambi i tipi di cellule alla fibronectina ed uno stato di iperadesività alle pareti vascolari forse attraverso un coinvolgimento della kinasi Src, substrato di CD45 (Shivtiel et al., 2011). Quest'ultima kinasi viene attivata dalle integrine che attivano anche un'altra kinasi che promuove la sopravvivenza della cellula leucemica. Infatti, l'interazione tra cellula leucemica e cellula stromale fa sì che le prime producano una kinasi che interagisce direttamente con una β -integrina, fosforila Akt in modo fosfatidil-inositolo-3 kinasi (PI3K) dipendente e GSK3 β con conseguente modulazione della via di segnale presieduta da Notch e fosforilazione del "Signal Transducer and Activation of Transcription 3" (STAT3). Sul versante opposto la cellula stromale attiva Akt, ERK1/2 e STAT3 con significativo aumento della produzione delle proteine Hes-1 e BCL-2.

Per quanto concerne la catena α del recettore per l'interleukina 3, questa è poco espressa dalla CSE ed invece molto espressa dalle CSL. Infatti, cellule leucemiche ottenute da colture ex vivo trattate con un anticorpo monoclonale anti catena α mostrano, a differenza delle CSE trattate allo stesso modo, una ridotta capacità di generare leucemia in topi NOD/SCID (Jin et al., 2009).

Lesioni geniche intrinseche al microambiente midollare capaci di promuovere la leucemogenesi

Nel 2007 Walkley et al. aveva dimostrato che modelli murini RAR γ / γ , cioè completamente carenti del recettore nucleare γ per l'acido retinoico, sviluppavano una malattia mieloproliferativa caratterizzata da un aumento dei progenitori granulocito-macrofagici e da un aumento di granulociti nel sangue periferico, nel midollo osseo e nella milza. Tale disordine mieloproliferativo era indotto dagli alti livelli di "Tumor necrosis factor alpha" (TNF- α) presenti nel microambiente midollare. Un altro studio condotto in modelli murini dallo stesso gruppo di ricerca aveva dimostrato che la perdita della proteina codificata dal gene del Retinoblastoma dal tessuto ematopoietico determinava una malattia mieloproliferativa caratterizzata da una mobilitazione delle CSE nel sangue periferico. Queste alterazioni non erano però direttamente determinate dalla cellula ematopoietica, ma erano bensì causate dal fatto che la carenza di proteina Rb induceva un'alterazione nei rapporti tra CSE e microambiente midollare (Walkley et al., 2007). Anche l'inattivazione di un componente dell'endocitosi mediata dal ligando di Notch, "Mind bomb 1" (Mib 1), era responsabile di una malattia mieloproliferativa rapidamente fatale caratterizzata da anemia, granulocitosi e progressiva infiltrazione mieloide di vari organi con conseguente epatosplenomegalia. Anche in questo caso il disordine mieloproliferativo era determinato da un'alterazione a livello del microambiente midollare (Kim et al., 2008). Infatti, tale disordine mieloproliferativo si sviluppa-

va anche quando i topi con carenza di Mib1 ricevevano CSE da topi “wild-type”, ma non si sviluppava se la regione intracellulare di Notch costitutivamente attivata veniva introdotta nel microambiente midollare di topi “Mib1 null”. Pertanto, l’attivazione di Notch risultava essere assolutamente necessaria per mantenere la normale omeostasi della CSE. Un’alterazione di questi rapporti con sviluppo di un disordine mieloproliferativo si poteva verificare anche in topi neonati che presentavano una delezione ubiquitaria di Ikb α con conseguente alterata espressione di Jagged-1 e permanente attivazione di Notch (Rupec et al., 2005). Un disordine mieloproliferativo era stato più recentemente osservato anche in topi con osteociti che presentavano una delezione della sub-unità Gs α delle proteine di segnale G, situate a valle del recettore per l’ormone delle paratiroidi, delle prostaglandine e di alcuni recettori β -adrenergici. In questi animali la malattia mieloproliferativa caratterizzata da un’eccessiva fuoriuscita di progenitori ematopoietici immaturi dal parenchima midollare era causata dall’eccesso di GCSF prodotto dagli osteociti mutati (Fulzele et al., 2012). Nel 2010 il rilevante ruolo del microambiente midollare nella patogenesi di disordini onco-ematologici era stato ulteriormente sottolineato da Raajimakers et al. Era stato osservato che in modelli murini la presenza di progenitori osteoidi “osterix” positivi con delezione del gene *Dicer1*, un endonucleasi responsabile della processazione dei miRNA, ma non di osteoblasti con la stessa delezione, determinava un quadro di mielodisplasia che progrediva in LAM secondaria. Quest’ultima era caratterizzata da leucocitosi con blastosi periferica, anemia, splenomegalia, sarcomi granulocitari e sviluppo di alterazioni citogenetiche. Le alterazioni a carico del tessuto ematopoietico erano interamente prodotte dal microambiente come veniva dimostrato dal fatto che il trapianto di CSE di topi con gene *Dicer1* mutato e SMD in topi con gene “wild-type” non comportava lo sviluppo di SMD nei topi trapiantati, mentre il trapianto di CSE di topi “wild-type” in topi con gene *Dicer1* mutato comportava la comparsa di SMD nei topi trapiantati. Il “gene expression profiling” dei progenitori osteoidi mutati rivelava una ridotta espressione del gene *Sbds* la cui mutazione è responsabile della sindrome di Schwachman-Bodian-Diamond, un quadro di insufficienza midollare che espone ad un alto rischio di evoluzione in LAM. Inoltre, la delezione di tale gene in modelli murini determinava un difettosa maturazione dei progenitori ematopoietici con sviluppo di un SMD. Questi dati indicavano quindi che l’alterato funzionamento di una sottopopolazione di cellule mesenchimali induceva un disordine della differenziazione, proliferazione e apoptosi di cellule eterologhe la cui omeostasi era totalmente alterata.

Tutte queste osservazioni suggeriscono che cellule stromali di pazienti con SMD/LAM possano contenere alterazioni genetiche responsabili dello sviluppo di tali disordini onco-ematologici e che sia proprio questa la ragione per cui pazienti con particolari malattie genetiche caratterizzate da alterazioni scheletriche abbiano un rischio di sviluppare una LAM particolarmente elevato. Questi dati hanno portato Raajimakers (2011) ad ipotizzare che la nicchia ematopoietica possa essere direttamente o indirettamente responsabile del processo di leucemogenesi. Nel primo caso il microambiente midollare funzionerebbe da “initiator” cioè potrebbe indurre un’eccessiva proliferazione e un’alterata maturazione di progenitori

ematopoietici che tenderebbero così ad acquisire lesioni geniche necessarie alla loro trasformazione e successivamente promuoverebbe l'espansione di una popolazione clonale aumentando così le probabilità di trasformazione neoplastica. In alternativa, le lesioni presenti nei progenitori ematopoietici potrebbero invece dipendere da uno stato di instabilità genica causato da un malfunzionamento del microambiente stesso. La trasformazione leucemica potrebbe però essere solo indirettamente favorita dal microambiente che quindi funzionerebbe da "facilitator": la nicchia promuoverebbe semplicemente l'espansione di una preesistente popolazione cellulare a cariotipo patologico. In questo modello le lesioni geniche presenti nei progenitori ematopoietici non sarebbero da sole sufficienti a determinare la trasformazione neoplastica ma lo diventerebbero solo in presenza di cellule stromali dotate di alterazioni capaci di creare un particolare microambiente.

Il microambiente midollare come luogo per sfuggire agli effetti tossici della chemio-radioterapia

Numerosi studi, alcuni più sopra elencati, indicano che il microambiente midollare può proteggere la cellula leucemica dagli effetti tossici della chemio-radioterapia. Le cellule stromali possono impedire l'apoptosi dei blasti leucemici sia producendo fattori solubili sia grazie ad un contatto diretto. La maggior parte delle cellule di LAL-B coltivate in vitro morivano dopo circa una settimana per effetto della prostaglandina A prodotta dai monociti presenti nel campione (Giordano et al., 1997). La coltura di linee cellulari leucemiche o di cellule leucemiche fresche insieme a cellule stromali murine rendeva le prime resistenti all'apoptosi indotta dalla privazione di siero o dal trattamento con citosina arabinoside (Garrido et al., 2001; Konopleva et al., 2002). Tale effetto, particolarmente evidente quando le cellule leucemiche erano state ottenute da pazienti con LAM chemio-resistente, dipendeva dalla capacità delle cellule stromali di modulare l'espressione di proteine Bcl2 presente in alta concentrazione nelle co-culture. Un altro studio aveva dimostrato un sinergismo tra la via di segnale di Bcl2 e quella delle "Mitogen Activated Protein Kinase" (MAPK): la loro contemporanea attivazione faceva sì che la cellula leucemica diventasse resistente all'apoptosi acquisendo un fenotipo particolarmente aggressivo (Milella et al., 2002). Linee cellulari di LAL-B coltivate in vitro insieme a cellule stromali ed in presenza di TGF- β e BMP-6 esprimevano TIEG1 ("TGF- β inducible early gene 1") diventando poco proliferanti e resistenti alla chemioterapia. Questi risultati suggerivano che TGF- β e BMP-6 potessero avere un ruolo molto importante nell'acquisizione di tale fenotipo (Dosen-Dahl et al., 2008). Siccome le cellule di LAL-B sintetizzano poca asparagina e sono quindi particolarmente sensibili alla deplezione di questo amminoacido, l'asparaginasi è un farmaco di prima scelta nella terapia di questa malattia. È stato però osservato che i blasti linfoidi possono essere protetti dagli effetti tossici dell'asparaginasi perché questa viene prodotta dalle cellule staminali mesenchimali ad una concentrazione che è venti volte superiore a quella dei blasti leucemici (Iwamoto et al., 2007). Cellule stromali derivate da cellule aderenti CD133 e CD34 positive possono formare strutture capillaro-simili ("vasculogenic mimicry") grazie alla

produzione di “insulin growth factor-1” (IGF1) che attiva la via di segnale della PI3K/GTPasi (Mirshahi et al., 2009).

Una protezione dagli effetti tossici della chemio-radioterapia può essere raggiunta anche grazie ad un contatto diretto tra cellula stromale e cellula leucemica. Nel 2007 Wang et al. aveva dimostrato che nella LAL-B Ph⁺ è presente una sottopopolazione di cellule che esprime marcatori delle cellule endoteliali e dei progenitori B commissionati. La coltura in vitro ed il contatto di questa sottopopolazione con cellule stromali ne modifica il profilo di espressione genica. In tal modo questa sottopopolazione leucemica acquisisce “early stem-cell markers”, viene indotta ad esprimere la Vascular-Endothelial cadherin (VE-C), stabilizza la β -catenina, sovra-esprime il gene di fusione, e non necessita più delle proteine Wnt per il “self-renewal”. Pertanto le cellule stromali creano un pool di CSL permanentemente quiescenti nonostante l’attivazione costitutiva della β -catenina, fattore che attiva la proliferazione, rendendo possibili le recidive tardive di malattia. È stato più recentemente osservato che la coltivazione in vitro di monociti e di cellule di leucemia acuta linfoblastica pre-B faceva sì che i primi venissero condizionati ad assumere un fenotipo infiammatorio caratterizzato da un’ aumentata espressione di CXCL10. Tale fenotipo, osservato anche in vivo, favoriva la migrazione e la capacità invasiva delle cellule leucemiche ma non aveva alcuna influenza sulla loro proliferazione e sull’angiogenesi (Lee et al., 2012).

L’ipossia è un altro fattore che consente al microambiente di midollare di promuovere il processo di leucemogenesi e proteggere le cellule leucemiche dai danni della chemio-radioterapia. Essa svolge un ruolo molto importante anche in condizioni fisiologiche visto che le CSE capaci di garantire la ricostituzione a lungo termine risiedono nelle regioni del microambiente midollare più povere di ossigeno. L’ipossia, ben studiata nei tumori solidi, può indurre non solo l’attivazione del fattore trascrizionale “Hypoxia Inducible Factor α ” (HIF α), ma anche uno stato di instabilità genica e di tolleranza immunologica promossa dal reclutamento di linfociti T regolatori determinato dalla produzione di CCL28 (Bristow et al., 2008; Facciabene et al., 2011). L’attivazione di HIF α fa sì che vengano espressi geni coinvolti nel metabolismo del glucosio, nell’angiogenesi, nell’invasione tumorale, nelle metastasi e nella resistenza al danno da radiazioni. La proteina HIF è un eterodimero formato da una sub-unità β stabile e da una sub-unità α O₂-sensibile, che si accumula in condizioni di ipossia. La sub-unità α può essere presente in due isoforme, la 1 α e la 2 α con azioni sia simili che antagoniste. Infatti, le due isoforme svolgono un diverso controllo su vari bersagli situati più a valle e interagiscono in modo isoforma specifico con particolari oncogeni e geni oncosoppressori come MYC e p53. In particolare, bersagli di HIF-1 α sono gli “Hypoxia Responsive Elements” presenti nelle sequenze di molti geni, i geni VEGF, c-Kit, FGF-2, Notch-1, vari fattori di crescita. Inoltre, HIF-1 α può promuovere o bloccare l’espressione di c-Myc e promuovendo la sovra-espressione della proteina p21^{waf1/cip1} rallenta il ciclo cellulare della CSE. È interessante segnalare che la doxorubicina e la daunorubicina sono potenti inibitori di HIF-1 perché ne bloccano il legame al DNA. La somministrazione giornaliera di tali molecole a topi SCID sottoposti a xenotrapianto di cellule leucemiche umane bloccava in

maniera rilevante la trascrizione di un gene reporter HIF-1 dipendente e quella di vari geni bersaglio di HIF-1 tra cui quelli che codificavano per VEGF, SDF-1 e SCF (Lee et al., 2008). Questi effetti sono stati confermati da un recente studio che ha anche dimostrato che in ratti con anemia la doxorubina bloccava l'attivazione indotta dal cuore dei bersagli di HIF1 (Tanaka et al., 2012). In molti tumori alti livelli di HIF1 α e di HIF-2 α determinano una prognosi sfavorevole, ma questo non è un dato costante. Nei gliomi con mutazione di IDH1 e IDH2 ad esempio HIF1 α sembra avere un'azione inibitoria nei confronti della crescita tumorale. In condizioni fisiologiche i due geni IDH1, IDH2 codificano per proteine che catalizzano la conversione dell'iso-citrato in 2-oxoglutarato (2-OG). In presenza di proteine mutate la riduzione NADPH-dipendente del 2-OG fa sì che vengano prodotti due enantiomeri R e S del metabolita 2-idrossiglutarato (2-HG), presente solo in piccole concentrazioni in cellule prive di mutazione. Dati recenti dimostrano che solo l'enantiomero R ha importanza per lo sviluppo del glioma. Infatti solo questo può fungere da substrato al posto di 2-OG nell'idrossilazione delle proteine HIF1 α e HIF-2 α promuovendone la degradazione (Young et al., 2012). Nel 10% delle LAM che presentano una mutazione di IDH1 o di IDH2, la mutazione attiva e stabilizza HIF1 α con promozione della glicolisi aerobica a conferma dell'ipotesi di Warburg secondo cui le cellule neoplastiche consumano preferenzialmente il glucosio che viene metabolizzato a lattato anche in presenza di ossigeno (Yusuf et al., 2012). L'ipossia specie in cellule proliferanti favorisce però anche uno stato di instabilità genica grazie ad un blocco dell'apoptosi ed a difetti nei meccanismi di riparo del DNA con conseguenti alterazioni cromatiniche e mutagenesi. L'associazione tra ipossia e danni del DNA è stata dimostrata da vari studi che avevano analizzato i danni da riperfusione tissutale, evento molto frequente nel contesto del microambiente midollare. Variazioni di flusso ematico inducono un aumento di "reactive oxygen species" (ROS) e di superossido dismutasi (Welbourn et al., 2001) con accumulo di 8-oxoguanina e timina e conseguente sviluppo di "transversions" GC \rightarrow TA, rotture del DNA a singolo o doppio filamento (SSB o DSB) (Bindra et al., 2005). Nel tessuto ematopoietico normale i ROS, prodotti dai mitocondri e dal reticolo endoplasmatico, inducono la fosforilazione e quindi l'attivazione di alcune protein chinasi tra cui la chinasi N-terminale c-Jun (JNK) e p38^{MAPK} che attraverso le proteine INK4 e p53 causano un arresto del ciclo cellulare e promuovono l'apoptosi. Nelle LAM la mutazione/attivazione di vari geni ed oncogeni, soprattutto la "Internal Tandem Duplication" (ITD) di FLT3, la mutazione di Ras con sua attivazione costitutiva e la mutazione di IDH1 e IDH2, determinano un aumento dei ROS con sviluppo di nuove lesioni geniche che possono determinare una chemio-radioresistenza (Sallmyr et al., 2008). Questo avviene perché le cellule leucemiche mostrano spesso l'attivazione di p38^{MAPK} ma l'inattivazione dei suoi bersagli p15^{INK4B} e p16^{INK4A}. Inoltre, l'aumento dei ROS determina un cattivo funzionamento delle vie di segnale da essi controllate, specie di quelle deputate alla proliferazione e sopravvivenza cellulare. I meccanismi responsabili di questo cattivo funzionamento sono tuttora sconosciuti, ma potrebbero essere simili, anche se iper-reattivi, a quelli che operano nei progenitori emopoietici normali. A questo proposito un ruolo molto

importante potrebbe essere svolto dalla fosforilazione di Akt che nei progenitori ematopoietici normali è indotta dai ROS ed è responsabile della risposta proliferativa a vari fattori di crescita (Hole et al., 2011). Nella cellula leucemica la fosforilazione di Akt è determinata non solo dalla ITD di FLT3 che attiva la via di segnale controllata da STAT5, ma anche da una mutazione di Ras. Anzi dati sperimentali indicano che la produzione di ROS indotta da NOX2, un membro delle ossidasi NADPH, fa sì che cellule umane CD34 positive con attivazione costitutiva di Ras proliferino, mentre invece blocca la proliferazione delle cellule normali (Hole et al., 2010). Questa osservazione ha suggerito che i ROS possano non solo favorire la proliferazione della popolazione leucemica, ma anche diffondere nelle cellule normali circostanti bloccandone la proliferazione con meccanismo paracrino. Tale suggestione sembra essere supportata dal fatto che nei pazienti con LAM i progenitori ematopoietici normali residui possono mostrare segni di stress ossidativo (Reddy et al., 2011).

Bibliografia

1. Ayala F, Dewar R, Kieran M, Kalluri R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia*. 2009; 23: 2233-2241.
2. Bindra RS, Glazer PM. Genetic instability and the tumor microenvironment: towards the concept of microenvironment-induced mutagenesis. *Mutation research*. 2005; 569: 75-85.
3. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997; 3: 730-737.
4. Bristow RG, Hill RP Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nature Cancer Reviews*. 2008; 8: 180-192.
5. Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, Sipkins DA. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science*. 2008; 322: 1861-1865.
6. Doan PL, Chute JP. The vascular niche: home for normal and malignant hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2011; 26: 54-62.
7. Døsen-Dahl G, Munthe E, Nygren MK, et al. Bone marrow stroma cells regulate TIEG1 expression in acute lymphoblastic leukemia cells: role of TGFbeta/BMP-6 and TIEG1 in chemotherapy escape. *Int J Cancer*. 2008; 123: 2759-2766.
8. Dvoráková M, Karafiát V, Pajer P, et al. DNA released by leukemic cells contributes to the disruption of the bone marrow microenvironment. *Oncogene*. 2012.
9. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature*. 2011; 475: 226-230.
10. Feng S, Cen J, Huang Y, et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins. *PLoS One*. 2011;: e20599.

11. Fulzele K, Krause DS, Barry K, et al. Myelopoiesis is regulated by osteocytes through G α -dependent signaling. *Blood* in press 2012-06-437160.
12. Garrido SM, Appelbaum FR, Willman CL, Banker DE. Acute myeloid leukemia cells are protected from spontaneous and drug-induced apoptosis by direct contact with a human bone marrow stromal cell line (HS-5). *Exp Hematol*. 2001; 29: 448-457.
13. Giordano L, Moldwin RL, Downie PA, et al. Growth inhibition of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cell lines by monocytes: a role for prostaglandin E₂. *Leuk Res*. 1997; 21: 925-932.
14. Hatfield KJ, Hovland R, Øyan AM, et al. Release of angiopoietin-1 by primary human acute myelogenous leukemia cells is associated with mutations of nucleophosmin, increased by bone marrow stromal cells and possibly antagonized by high systemic angiopoietin-2 levels. *Leukemia*. 2008; 22: 287-293.
15. Hatfield KJ, Reikvam H, Bruserud Ø. The crosstalk between the matrix metalloprotease system and the chemokine network in acute myeloid leukemia. *Curr Med Chem*. 2010; 17: 4448-4461.
16. Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of Kit-ligand. *Cell*. 202; 109: 625-637.
17. Heuser M, Park G, Moon E, et al. Extrinsic signals determine myeloid-erythroid lineage switch in MN1v leukemia. *Exp Hematol*. 2010; 38: 174-179.
18. Hole PS, Darley RL, Tonks A. Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias? *Blood*. 2011; 117: 5816-5826.
19. Hole PS, Peam L, Tonks A, et al. Ras-induced reactive oxygen species promote growth factor-independent proliferation in human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2010; 115: 1238-1246.
20. Hu X, Shen H, Tian C, et al. Kinetics of normal hematopoietic stem and progenitor cells in a Notch1-induced leukemia model. *Blood*. 2009; 114: 3783-3792.
21. Huan J, Hornick NI, Shurtleff MJ, et al. RNA trafficking by acute myelogenous leukemia exosomes. *Cancer Res*. 2013; 73: 918-929.
22. Ichihara E, Kaneda K, Saito Y, et al. Angiopoietin1 contributes to the maintenance of cell quiescence in EVII(high) leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 416: 239-245.
23. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotech*. 2007; 25: 1315-1321.
24. Iwamoto S, Mihara K, Downing JR, et al. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J Clin Invest*. 2007; 117: 1049-1057.
25. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, et al. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med*. 2006; 12: 1167-1174.
26. Jin L, Lee EM, Ramshaw HS, et al. Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009; 5: 31-42.

27. Kato I, Niwa A, Heike T, et al. Identification of hepatic niche harboring human acute lymphoblastic leukemic cells via the SDF-1/CXCR4 axis. *PLoS One*. 2011; 6: e27042.
28. Kerbaudy DM, Lesnikov V, Torok-Storb B, Bryant E, Deeg HJ. Engraftment of distinct clonal MDS-derived hematopoietic precursors in NOD/SCID-beta2-microglobulin-deficient mice after intramedullary transplantation of hematopoietic and stromal cells. *Blood*. 2004; 104: 2202-2203.
29. Kim Y-W, Koo B-K, Jeong H-W, et al. Defective Notch activation in microenvironment leads to a myeloproliferative disease. *Blood*. 2008; 112: 4628-4638.
30. Konopleva M, Konoplev S, Hu W, et al. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia*. 2002; 16: 1713-1724.
31. Kristov AV, Twomey D, Feng Z, et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*. 2006; 442: 818-822.
32. Krivtsov AV, Figueroa ME, Sinha AU, et al. Cell of origin determines clinically relevant subtypes of MLL-rearranged AML. *Leukemia*. 2012.
33. Lane SW, Wang YJ, Lo Celso C, et al. Differential niche and Wnt requirements during acute myeloid leukemia progression. *Blood*. 2011; 118: 2849-2856.
34. Lee K, Qian DZ, Rey H, et al. Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 2353-2358.
35. Lee Y, Chittethath M, Andr e V, et al. Protumoral role of monocytes in human B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: involvement of the chemokine CXCL10. *Blood*. 2012; 119: 227-237.
36. Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, et al. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med*. 2003; 9: 1158-1165.
37. Milella M, Estrov Z, Kornblau SM, et al. Synergistic induction of apoptosis by simultaneous disruption of the Bcl-2 and MEK/MAPK pathways in acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2002; 99: 3461-3464.
38. Mirshahi P, Rafii A, Vincent L, et al. Vasculogenic mimicry of acute leukemic bone marrow stromal cells. *Leukemia*. 2009; 23: 1039-1048.
39. Nervi B, Ramirez P, Rettig MP, et al. Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood*. 2009; 113: 6206-6214.
40. Ninomiya M, Abe A, Katsumi A, et al. Homing, proliferation and survival sites of human leukemia cells in vivo in immunodeficient mice. *Leukemia*. 2007; 21: 136-142.
41. Paupert J, Mansat-De Mas V, Demur C, et al. Cell-surface MMP-9 regulates the invasive capacity of leukemia blast cells with monocytic features. *Cell Cycle*. 2008; 7: 1047-1053.
42. Raajmakers MH Niche contribution to oncogenesis: emerging concepts and implications for the hematopoietic system. *Haematologica*. 2011; 96: 1041-1048.

43. Raajimakers MH, Mukherjee S, Guo S, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukemia. *Nature*. 2010; 464: 852-857.
44. Reddy MM, Fernandes MS, Salgia R, et al. NADPH oxidases regulate cell growth and migration in myeloid cells transformed by oncogenic tyrosine kinases. *Leukemia*. 2011; 25: 281-289.
45. Rombouts EJ, Pavic B, Löwenberg B, Ploemacher RE. Relation between CXCR-4 expression, Flt3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004; 104: 550-557.
46. Rupec RA, Jundt F, Rebholz B, et al. Stroma-mediated dysregulation of myelopoiesis in mice lacking I κ B α . *Cell*. 2005; 22: 479-481.
47. Sallmyr A, Fan J, Rassol FV. Genomic instability in myeloid malignancies: increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repair. *Cancer Letters*. 2008; 270: 1-9.
48. Salvestrini V, Zini R, Rossi L, et al. Purinergic signaling inhibits human acute myeloblastic leukemia cell proliferation, migration, and engraftment in immunodeficient mice. *Blood*. 2012; 119: 217-226.
49. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978; 4: 1-12.
50. Shivtiel S, Lapid K, Kalchenko V, et al. CD45 regulates homing and engraftment of immature normal and leukemic human cells in transplanted immunodeficient mice. *Exp Hematol*. 2011; 39: 1161-1170.
51. Sipkins DA, Wei X, Wu JW, et al. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumor engraftment. *Nature*. 2005; 435: 969-973.
52. Tanaka T, Yamaguchi J, Shoji K, et al. Anthracycline inhibits recruitment of hypoxia-inducible transcription factors and suppresses tumor cell migration and cardiac angiogenic response in the host. *J Biol Chem*. 2012; 287: 34866-34882.
53. Tavor S, Petit I, Porozov S, et al. CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. *Cancer Res*. 2004; 64: 2817-2824.
54. Tian C, Zheng G, Cao Z, et al. Hes1 mediates the different responses of hematopoietic stem and progenitor cells to T cell leukemic environment. *Cell Cycle*. 2013; 12: 322-331.
55. Viale A, De Franco F, Orleth A, et al. Cell-cycle restriction limits DNA damage and maintains self-renewal of leukemia stem cells. *Nature*. 2009; 457: 51-57.
56. Walkley CR, Olsen GH, Dworkin S, et al. A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor γ deficiency. *Cell*. 2007; 129: 1097-1110.
57. Walkley CR, Shea JM, Sims NA, et al. Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. *Cell*. 2007; 129: 1081-1085.
58. Wang L, O'Leary H, Fortney, et al. Ph⁺/VE-cadherin⁺ identifies a stem cell-like population of acute lymphoblastic leukemia sustained by bone marrow niche cells. *Blood*. 2007; 110: 3334-3344.

59. Wei J, Wunderlich M, Fox C, et al. Microenvironment determines lineage fate in a human model of MLL-AF9 leukemia. *Cancer Cell*. 2008; 13: 483-495.
60. Welbourn CR. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg*. 1991; 78: 651-655.
61. Wiseman DH. Donor cell leukemia: a review. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011; 17: 771-789.
62. Xue J, Lim S, Yang Y, et al. PDGF-BB modulates hematopoiesis and tumor angiogenesis by inducing erythropoietin production in stromal cells. *Nat Med*. 2012; 18: 100-110.
63. Young RM, Simon MC. HIF-a: pro- and antitumorogenic? *Nat Med*. 2012; 18: 1024-1025.
64. Yusuf RZ, Wang Y-H, Scadden DT. Metabolic priming for AML. *Nat Med*. 2012; 18: 865-867.
65. Zeng Z, Shi YX, Samudio IJ, et al. Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. *Blood*. 2009; 113: 6215-6224.

Intervento di fattori microambientali nell'evoluzione della LMC Ph1-pos

Daniela Cilloni

Dipartimento di Oncologia, Università di Torino

La Leucemia Mieloide Cronica (LMC) è un disordine clonale che origina da progenitori staminali emopoietici che vengono trasformati dall'oncogene BCR-ABL. La deregolata attività tirosin chinasi della proteina BCR-ABL porta a un' aumentata proliferazione, ridotta apoptosi e alterazione dell'adesione e del contatto con il microambiente midollare¹.

Gli inibitori dell'attività tirosino-chinasi (TKI) sono risultati molto efficaci nel trattamento dei pazienti affetti da Leucemia Mieloide Cronica ma non sembrano in grado di eliminare la cellula staminale leucemica Philadelphia positiva che rimane dunque una potenziale sorgente di ricaduta della malattia¹. Infatti, circa la metà dei pazienti in remissione molecolare maggiore da anni che sospendono la terapia con TKI vanno incontro a ripresa di malattia con ricomparsa del trascritto BCR-ABL². Diversi dati della letteratura suggeriscono che gli inibitori TK siano in grado potenzialmente di spegnere l'attività chinasi di BCR-ABL all'interno delle cellule staminali³.

Resta pertanto da chiarire se la sopravvivenza delle cellule staminali leucemiche sia dovuta all'attivazione di vie alternative.

Recentemente si ipotizza un ruolo attivo del microambiente midollare nel proteggere le cellule staminali leucemiche dall'azione farmacologica di diversi agenti utilizzati fino ad oggi nel trattamento delle cellule staminali^{4,5}. Sembrerebbe che la quiescenza delle cellule staminali favorisca particolarmente la resistenza all'apoptosi indotta da TKI.

Evidenze sperimentali mostrano che la nicchia midollare è formata da diverse zone, quella che potremmo chiamare nicchia vascolare ricca di cellule endoteliali, e la nicchia endostale ricca di osteoblasti e osteoclasti. Gli osteoblasti formano contatti con le cellule emopoietiche grazie alla presenza di molecole di adesioni quali caderine, integrine come VLA4 e VLA5. Una volta a contatto con gli osteoblasti i progenitori emopoietici mantengono uno stato di quiescenza inibendo il ciclo cellulare. È dimostrato che in questa fase down regolano alcuni geni quali c-kit, FLT3, MP, il recettore di IL6 e del TGFbeta.

La tensione di ossigeno della nicchia endostale è inferiore a quella della nicchia vascolare. I progenitori quiescenti pertanto si localizzano prevalentemente nella

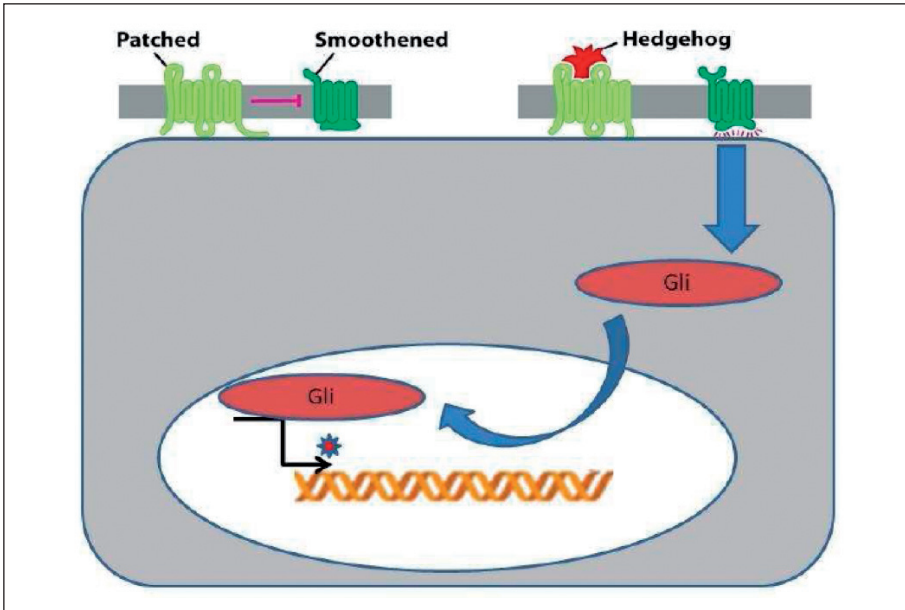


Fig. 1 - Pathway di Hedgehog: il ligando Sonic Hedgehog lega il recettore Patch che cessa di inibire Smo. Smo attiva Gli che trascrive i geni a valle. Hedgehog è un ligando prodotto sia dalle cellule staminali che dal microambiente midollare (Adattato da Cilloni, Saglio: molecular pathways: BCR-ABL. Clin Cancer Res. 2012 15; 18 (4): 930-937).

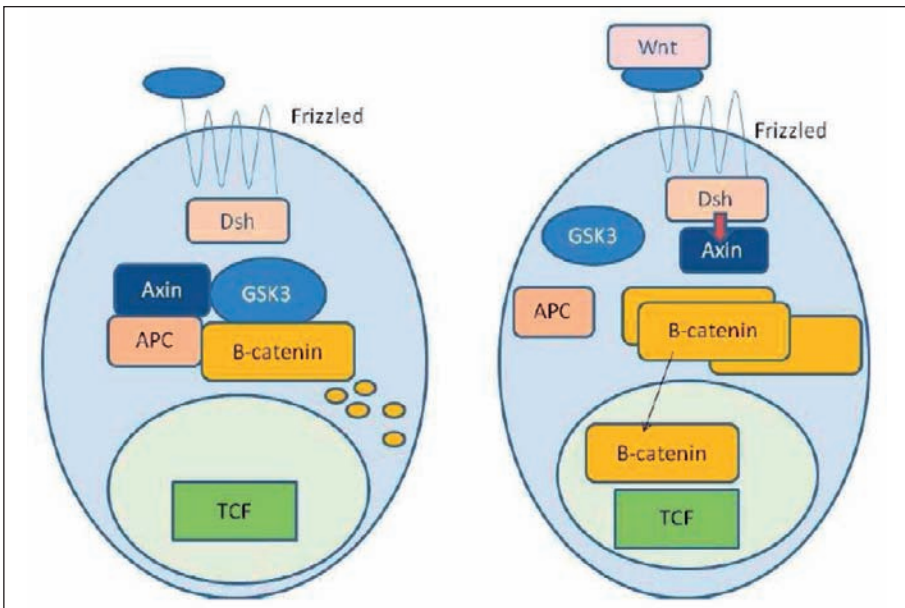


Fig. 2 - Pathway di Wnt il ligando lega il recettore Frizzled. Dopo il legame Axin GSK3 APC e Beta-catenina e APC perdono il contatto e Beta-catenina entra nel nucleo e attiva il segnale (Adattato da Cilloni, Saglio: molecular pathways: BCR-ABL. Clin Cancer Res. 2012; 18: 930-937).

nicchia ipossica. Il ruolo dell'ipossia nella sopravvivenza della cellula staminale leucemica è ad oggi oggetto di numerosi studi.

Recentemente è stato ipotizzato che le coculture di cellule stromali mesenchimali (MSC) e di progenitori emopoietici leucemici inibiscono in modo selettivo l'apoptosi indotta da TKI garantendo la capacità di formare colonie e di "homing" quando trapiantati in topi immunodeficienti⁶.

Sebbene è dimostrato che le cellule staminali mesenchimali non fanno parte del clone leucemico, tuttavia sono in grado di inibire le cellule staminali leucemiche verosimilmente attraverso un'incrementata produzione di interferone⁶.

Alcuni esperimenti condotti da Jin et al.⁷ hanno evidenziato un ruolo chiave dell'asse CXCR4/CXCL12 proteggere i progenitori leucemici. Lo studio suggerisce che Imatinib indurrebbe un aumento dei livelli di CXCR4 favorendo la migrazione dei progenitori leucemici nel microambiente⁷. Quest'ultimo, in particolare il microambiente ipossico, si pensa sia in grado di proteggere i progenitori leucemici principalmente esponendoli all'ipossia che ne ridurrebbe la quiescenza rendendoli meno sensibili all'azione farmacologica.

Diversi pathways inoltre sono stati ritenuti implicati nella sopravvivenza della cellula staminale leucemica inclusi Hedgehog, Wnt, Notch. Il pathway di Hedgehog, noto per il suo ruolo nello sviluppo embrionale e nella riparazione tissutale gioca un ruolo cruciale nel mantenimento della cellula staminale leucemica^{8,9}. Sonic Hedgehog (SHh) è un ligando solubile secreto sia dalle cellule stromali che dalle cellule leucemiche. Lega il recettore Patched che si trova a livello di cellule staminali emopoietiche. Il legame di Hh a Patch libera Smo che può pertanto attivare il segnale nucleare attivando Gli, il fattore trascrizionale responsabile del segnale. Tra i geni target di Gli risultano essere lo stesso Patch, la ciclina D1, e Bcl2⁸⁻¹⁰.

Recentemente è stato dimostrato che Sonic hedgehog e il fattore trascrizionale Gli sono significativamente elevati nelle cellule staminali di CML rispetto alla controparte normale e ancora più elevati nelle fasi accelerate e crisi blastiche suggerendo un loro ruolo nella progressione di malattia. Risulta interessante il fatto che la delezione di Smo nel modello murino di CML induce una deplezione delle LSC ma non delle cellule staminali normali. Inoltre è dimostrato anche che Imatinib non ha significative effetti sui componenti del pathway di hedgehog.

Oltre a Hh altri pathway come Notch hanno un ruolo importante nell'espansione della nicchia emopoietica. Il pathway di Wnt è inoltre responsabile del self renewal della cellula staminale leucemica.

Un'anomala funzione di Beta-catenina è stata dimostrata nelle cellule di CML e di leucemia linfoblastica acuta (ALL). Tuttavia sebbene sia noto il ruolo delle cellule mesenchimali, che producono Hh, Wnt, Notch, citochine e chemochine, nel regolare l'emopoiesi, poco ancora è noto sul rapporto tra le cellule stromali e le cellule staminali leucemiche.

In conclusione ci sono diversi meccanismi sia intrinseci che estrinseci alla cellula staminale leucemica che ne favoriscono l'automantenimento e il self renewal e la sopravvivenza dall'apoptosi indotta da inibitori tirosin chinasi. Il microambiente midollare favorisce questa resistenza attraverso meccanismi in parte noti ma in gran parte ancora sconosciuti.

Bibliografia essenziale

1. Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999; 340: 1330-1340.
2. Mahon FX, Rea D, Guilhot J, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol.* 2010; 11: 1029-1035.
3. Chu S, McDonald T, Lin A, et al. Persistence of leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia patients in prolonged remission with imatinib treatment. *Blood.* 2011; 118: 5565-5572.
4. Scadden DT. The stem cell niche in health and leukemic disease. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007; 20: 19-27.
5. Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood.* 2009; 114: 1150-1157.
6. Zhang HM, Zhang LS, Zheng Ai. 2009; 28: 29-32.
7. Jin L, Tabe Y, Konoplev S, et al. CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7: 48-58.
8. Long B, Zhu H, Zhu C, Liu T, Meng W. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2011; 30.
9. Zhao C, Chen A, Jamieson CH, Fereshteh M, Abrahamsson A, Blum J, Kwon HY, Kim J, Chute JP, Rizzieri D, Munchhof M, VanArsdale T, Beachy PA, Reya T. *Nature.* 2009; 458: 776-779.
10. Chen Y, Peng C, Sullivan C, Li D, Li S. *Leukemia.* 2010; 24: 1545-1554.

Cellule staminali quiescenti e ricadute leucemiche tardive

Paolo Bernasconi, Marina Boni, Paola Maria Cavigliano, Irene Dambruoso, Barbara Rocca, Rita Zappatore, Celeste Calvello, Ilaria Giardini, Antonella Orlando, Marilena Caresana, Angela Pasi, Mirko Farina, Valeria Fiaccadori, Francesco Ripamonti

Divisione di Ematologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Università di Pavia

Una recidiva leucemica tardiva, definita come una ricomparsa della malattia dopo un intervallo di remissione completa (RC) di durata superiore a 5 anni, è un fenomeno quanto mai raro. Solo due casistiche hanno valutato l'incidenza di tale fenomeno ed hanno analizzato il decorso clinico di tali pazienti (Medeiros et al., 2007; Verma et al., 2010). Nella prima casistica, che comprendeva 493 pazienti, una recidiva tardiva era avvenuta in quindici pazienti con remissione completa della durata mediana di 104.5 mesi e costituiva il 3% di tutte le recidive. L'età mediana di questi pazienti era 48 anni, il rapporto maschi femmine era di 8:7, il valore mediano dei globuli bianchi alla diagnosi era stato $32.5 \times 10^9/L$, nove pazienti avevano mostrato un citotipo M4-M5, cinque dei sette pazienti analizzati dalla citogenetica avevano mostrato un cariotipo normale. Al momento della recidiva tre dei dodici pazienti analizzati avevano mostrato un cariotipo patologico. La terapia di re-induzione della remissione aveva permesso a 13/15 pazienti di ottenere una II RC seguita in sette pazienti da un trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (CSE).

La durata mediana della II RC era stata di 12.1 mesi ed otto pazienti erano deceduti. Pertanto, questo piccolo gruppo di pazienti aveva mostrato una sopravvivenza libera da malattia ed una sopravvivenza complessiva a cinque anni del 59% e 51% rispettivamente. In una seconda casistica, che comprendeva 2347 LAM dell'adulto, 1.366 pazienti avevano raggiunto una RC che aveva avuto una durata inferiore a 5 anni in 1.151 e superiore a 5 anni in 215. Una recidiva tardiva era avvenuta in 11/215 pazienti, nello 0.8% dei pazienti che avevano raggiunto la RC ed aveva costituito l'1.1% di tutte le recidive. Alla diagnosi l'età mediana di questi 11 pazienti era stata di 66 anni ed il valore mediano dei globuli bianchi alla diagnosi era stato $2.3 \times 10^9/L$. La durata mediana della I RC era stata di 81 mesi. Una IIRC della durata mediana di un solo mese era stata raggiunta solo in quattro pazienti (Verma et al., 2010). Entrambi gli studi dimostrano quanto sia cattiva la prognosi delle LAM in recidiva e quanto sia difficile il loro trattamento. Dal punto di vista

biologico nella casistica di Medeiros et al. (2007) i pazienti in recidiva avevano mostrato lo stesso assetto citogenetico dell'esordio mentre questo non era avvenuto nella casistica di Verma et al. (2010) dove cinque degli otto pazienti con dato citogenetico disponibile avevano mostrato un assetto citogenetico diverso tra diagnosi e recidiva. Questi dati indicano che la recidiva tardiva potrebbe avvenire per espansione della stessa popolazione leucemica presente alla diagnosi, per espansione di una popolazione clonale che rispetto a quella presente alla diagnosi aveva acquisito ulteriori lesioni citogenetiche e molecolari. Studi di "Next Generation Sequencing" hanno però dimostrato che sin dalla diagnosi la popolazione leucemica è costituita da sottopopolazioni dotate di una lesione genica comune associata a lesioni citogenetiche e molecolari diverse che potrebbero essere responsabili della loro differente attività proliferativa (Ding et al., 2011). Solo le cellule leucemiche in intensa proliferazione sarebbero eliminate dalla chemioterapia intensiva convenzionale, mentre quelle quiescenti sarebbero invece protette dagli effetti tossici della stessa e potrebbero quindi causare una ripresa tardiva della malattia. Siccome lo stato di quiescenza a breve o lungo termine, anche definita dal termine anglosassone "Dormancy", è una caratteristica delle cellule staminali adulte, le cellule leucemiche quiescenti sono anche chiamate cellule staminali leucemiche (CSL) e costituiscono lo 0,1-1% dell'intera popolazione leucemica. Un'importante caratteristica di queste cellule è quella di essere capaci di generare leucemia in modelli murini NOD/SCID sottoposti a xenotrapianto di cellule leucemiche umane (Lapidot et al., 1994).

La presenza di cellule staminali dormienti e la possibilità che cellule leucemiche mature possano de-differenziarsi riacquisendo le caratteristiche della CSL fanno sì che le attuali terapie comprese quelle molecolari non siano totalmente eradicanti permettendo la persistenza di un'eventuale malattia minima residua (MMR) difficilmente dimostrabile da metodiche come quelle attuali dotate insufficiente sensibilità. Dato ancor più rilevante, se le cellule leucemiche non sostengono la malattia o rimangono dormienti la dimostrazione di un'eventuale MMR non è indicativa di recidiva di malattia. La quiescenza della CSL dipende da vie molecolari attivate dalla cellula leucemica (meccanismi intrinseci) o dal microambiente midollare (meccanismi estrinseci).

Meccanismi di quiescenza intrinseci alla CSE e alla CSL

p53

Studi recenti hanno dimostrato che questo gene oncosoppressore oltre a regolare la risposta cellulare allo stress controlla anche lo stato di quiescenza della CSE in condizioni di "steady-state". Infatti nei topi con deficit di p53 il pool di CSE è aumentato ma poche cellule del pool sono quiescenti. Lo stato di quiescenza indotto da p53 non dipende dall'espressione di p21 ma invece dall'espressione di due suoi bersagli, Gfi-1 ("growth factor independent 1") e Necdin. Il primo, un repressore "Zinc-finger", mantiene l'integrità del pool di CSE perché ne riduce la proliferazione, mentre il secondo, una proteina che blocca la crescita, controlla la risposta della CSE allo stress genotossico con meccanismi dipendenti ed indipendenti dal

ciclo cellulare. È stato osservato che in condizioni di “steady state” *Necdin* agisce in sinergia con p53 promuovendo la quiescenza della CSE mentre in condizioni di stress genotossico blocca l’apoptosi indotta da p53. Infatti, un recente studio aveva dimostrato che topi sottoposti a xenotrapianto di CSE e progenitori emopoietici umani “*Necdin-null*” mostravano una ematopoiesi più sensibile ai danni indotti dalla chemio-radioterapia per aumento dell’apoptosi indotta da p53 (Asai et al., 2012). Un altro studio aveva stabilito che la sovra-espressione di *Necdin* impediva all’attivazione di p53 indotta dalla nutlina 3 di arrestare la crescita di cellule di carcinoma ovarico a bassa malignità.

Questo evento favoriva l’ulteriore trasformazione neoplastica e faceva aumentare l’instabilità genomica di queste cellule (Lafontaine et al., 2012). L’espressione di p53 viene modulata anche dal “Myeloid ELF1-like factor” (MEF/ELF4), un fattore trascrizionale che appartiene alla famiglia ETS e che può essere sovra-espresso in molte neoplasie. È stato recentemente osservato che MEF/ELF4 può essere attivato dalla mutazione del gene della nucleofosmina 1, lesione genica molto frequente nelle LAM. In pratica MEF/ELF4 si lega ad una particolare regione di NPM1. Se il complesso che si forma contiene il gene NPM1 in conformazione “wild-type” vengono bloccati il legame di al DNA e l’attività trascrizionale di MEF/ELF4 sul promotore di HDM2, se invece il complesso contiene il gene NPM1 mutato queste attività vengono attivate. Pertanto, l’aumentata espressione di HDM2 nelle LAM NPM1 positive sembra svolgere un ruolo chiave nel processo di leucemogenesi indotto da MEF/ELF4 (Ando et al., 2013). Quest’ultimo modulando l’espressione di p53 facilita la proliferazione di CSE quiescenti e ne aumenta il “self-renewal”. In modelli murini le CSE MEF/ELF4 null mostrano un aumento della quiescenza p53 dipendente e una resistenza agli effetti mielosoppressivi della radio-chemioterapia.

Tutti questi meccanismi attivati da p53 per indurre la quiescenza della CSE potrebbe però non essere operativi nelle LAM con mutazione o delezione di p53. Queste lesioni geniche, che contraddistinguono pazienti con malattia resistente alla chemioterapia si sviluppano però con una frequenza che è inferiore a quella dei tumori solidi. Infatti tali lesioni si osservano nel 10% delle LAM de novo e nel 30% delle LAM secondarie. Pertanto la mutazione di p53 si osserva in una minoranza delle LAM e se la via di segnale presieduta da questo oncogene è integra, la possibilità di alterare l’interazione tra p53 e MDM2 potrebbe consentire l’apoptosi della CSL (Saha et al; 2010). Una piccola molecola molto utile a questo scopo è nutlin 3 o3a che funziona da inibitore di MDM2. Studi recenti hanno dimostrato che tale molecola impiegata da sola o in associazione con la chemioterapia può effettivamente indurre l’apoptosi delle cellule leucemiche (Zhang et al., 2010). L’interazione tra nutlin 3/3a e CSL è tuttora sconosciuta ma è stato dimostrato che l’apoptosi di quest’ultima è indotta dall’attivazione di geni “target” di p53 come Bax e Gadd45 e forse p21^{cip1/waf1}. Anche la combinazione di un inibitore del proteosoma con un’antraciclina come l’idarubicina può indurre un’apoptosi p53-dipendente della CSL e risparmiare la CSE normale (Tergaonkar et al, 2002), evento che può essere ottenuto anche con l’impiego della parthenolide (Guzman et al., 2007).

Reactive Oxygen Species (ROS), FoxOs, ATM

La CSL esprime vari oncogeni e geni mutati, soprattutto l'“Internal Tandem Duplication” ITD di Flt3, la mutazione di Ras, di IDH1/IDH2 e altri che potrebbero promuovere la produzione di ROS. In condizioni normali la via di segnale presieduta dal tuberous sclerosis complex (TSC)-mammalian target of rapamycin (mTOR) riduce la concentrazione dei ROS prodotti dalla CSE garantendone la quiescenza (Chen et al., 2008). Questo obiettivo è raggiunto anche grazie all'attivazione delle proteine FoxO e di ATM, un regolatore del ciclo cellulare attivato da danni genotossici. ATM è attivato in CSE rapidamente ciclanti e topi con deficit di ATM presentano alti livelli di ROS, assenza di CSE quiescenti e lenta ma progressiva evoluzione verso un quadro di insufficienza midollare. Altri regolatori negativi di mTOR come Fbw7 (Thompson et al., 2007), PTEN (Yilmaz et al., 2008) e PML (Ito et al., 2008) mantengono la CSE quiescente e la loro perdita causa un'eccessiva proliferazione ed un progressivo esaurimento del pool staminale. Recentemente, da un'attenta analisi dei meccanismi che controllano lo stato ossidativo della cellula leucemica è in realtà emerso che la CSL presenta bassi livelli di ROS ed un'aberrante sovra-espressione di BCL-2 la cui inibizione causava una riduzione della fosforilazione ossidativa con conseguente selettiva eradicazione delle CSL quiescenti (Lagadinou et al., 2013). Questa osservazione completava i risultati di studi condotti in precedenza e costituiva il razionale per l'impiego di inibitori di BCL-2 nella pratica clinica. Konopleva et al (2006) aveva analizzato il meccanismo d'azione di una piccola molecola BH3 mimetica, ABT-737. Quest'ultima alterava l'interazione BCL-2/BAX e la funzione mitocondriale e determinava la morte delle cellule leucemiche CSL compresa, ma non era efficace se BCL-2 era fosforilata o se i livelli di proteina MCL1 erano aumentati. Tuttavia, questi ultimi due eventi venivano bloccati dalla contemporanea inibizione della via di segnale presieduta da MEK1/ERK che consentiva ad ABT-737 di tornare ad essere efficace. Più recentemente lo stesso autore aveva dimostrato che l'interazione tra ABT-737 e le MAP kinasi aveva un inaspettato effetto anti-apoptotico rimosso però dal contemporaneo impiego di ABT-737 e di inibitori di MEK1 (Konopleva 2012). Un altro studio aveva poi dimostrato un sinergismo tra inibitori di Akt/mTOR e ABT-737 nel determinare la morte delle cellule leucemiche e nel ridurre la capacità delle cellule leucemiche di formare colonie (Rahamani et al., 2013). Quest'azione, che non si verificava nei confronti delle cellule CD34 positive normali, era mediata dall'attivazione di GSK3 e da BIM. Questo stesso meccanismo d'azione veniva attivato dalla combinazione di un altro inibitore di BCL-2, l'Obatoclax, con il sorafenib, un inibitore di Flt3 (Rahamani et al., 2012). Un altro inibitore di BCL2, il maritoclax, aumenta la sensibilità alla chemioterapia determinando la morte di un gran numero di cellule leucemiche coltivate in vitro o trapiantate in modelli murini perchè riduce l'espressione di MCL-1 (Glaser et al., 2012).

Per quanto riguarda ATM è stato osservato che, dopo un danno genotossico, tale proteina si associa all'“essential modulator” del nuclear factor kappaB (NF- κ B) (NEMO), l'unità regolatoria della kinasi I kappaB (IKK) che fosforila l'inibitore di NF- κ B, I κ B (Wu et al., 2006). ATM fosforila NEMO a livello della serina

85 per promuovere la sua esportazione nucleare ubiquitina-dipendente, ma ATM viene trasferito anche nel citoplasma in modo NEMO dipendente e qui si associa e causa l'attivazione ELKS (proteina ricca in glutamato, leucina e serina) dipendente di IKK. È stato osservato che le cellule CD34+ delle sindromi mielodisplastiche (SMD) ad alto rischio e delle LAM presentano l'attivazione costitutiva di NF- κ B. In colture in vitro la combinazione di un inibitore di NF- κ B con farmaci impiegati dalla chemioterapia convenzionale non determinava l'apoptosi delle cellule blastiche che invece avveniva in presenza dell'inibitore e di assenza di sostanze nutritive (Fabre et al., 2007). Questi risultati indicavano che l'inibizione di NF- κ B faceva precipitare la cellula in una crisi bioenergetica che come risposta allo stress sviluppava un processo di autofagia seguito dalla morte per apoptosi. Il ruolo di ATM in questo processo è sottolineato dal fatto che nelle SMD ad alto rischio e nelle LAM la sua fosforilazione a livello della serina in posizione 1981 è necessaria per l'attivazione del nuclear factor kappa B (NF- κ B) (Grosjean-Raillard et al., 2009). Infatti, in una linea cellulare che mostrava l'interazione nucleare della proteina ATM mutata con NEMO, l'inibizione di ATM ne sopprimeva l'auto-fosforilazione, bloccava l'interazione con NEMO, determinava la fuoriuscita di NEMO e di un attivatore di NF- κ B dal nucleo, aboliva la fosforilazione delle proteine catalitiche IKK, faceva aumentare l'espressione di I kappaB alfa e causava la ri-localizzazione di NF- κ B dal nucleo al citoplasma con apoptosi della cellula. L'importanza di ATM era stata sottolineata anche da un recente studio che aveva dimostrato come la combinazione di clofarabina-fludarabina e busulfano in concentrazioni inferiori a quelle usualmente impiegate fosse molto efficace per attivare i componenti della via di segnale che controllava la risposta al danno del DNA (Valdez et al., 2011). Questa via di segnale era attivata da rotture a doppio filamento causate dal blocco delle polimerasi α ed ϵ indotte dalla clofarabina e dalla fludarabina in combinazione con il "cross-linking" del DNA mediato dal busulfano. In particolare, l'auto-fosforilazione di ATM a livello della serina in posizione 1981 determinava la fosforilazione delle proteine SMC1 e SMC3 che formavano un complesso che consentiva ai "sister chromatid exchange" di rimanere coesi durante la replicazione del DNA. La combinazione di clofarabina e fludarabina determinava anche una metilazione degli istoni 3 e 4 con rimodellamento della cromatina che poteva divenire più facilmente accessibile all'alkilazione indotta dal busulfano. Questo processo poteva essere molto efficace per perpetuare il danno genotossico ed indurre l'apoptosi della cellula leucemica (Valdez et al., 2011). Un cenno particolare merita PTEN ("Phosphatase and TENSin homolog deleted on chromosome 10) che insieme alla fosfatidil inositolo 3 chinasi (PI3K), Akt e mTOR fa parte di un'importante via di segnale attivata in molte LAM responsabile dell'eccessiva proliferazione e sopravvivenza della cellula leucemica e della resistenza alla chemioterapia (Misaghian et al., 2009). La sovra-espressione di PI3K/PTEN è stata osservata anche a livello delle CSL umane trapiantate in modelli murini NOD/SCID e determina un blocco dell'apoptosi. Nonostante queste osservazioni Tamburini et al. (2007) aveva dimostrato che l'attivazione di questa via di segnale comportava una prognosi favorevole forse perché determinava una progressione delle cellule leucemiche più immature verso la fase S del ciclo cel-

lulare rendendole più sensibili agli effetti citotossici della chemioterapia. CSE con delezione del gene PTEN, che codifica per una proteina che riduce l'espressione di PI3K, dopo un'iniziale espansione andavano incontro ad un progressivo esaurimento (Yilmaz et al., 2006). Inoltre, topi con CSE e cellule del microambiente PTEN "null" sviluppavano una malattia mieloproliferativa che poi evolveva in leucemia, mentre topi con CSE PTEN "null" ma cellule del microambiente che esprimevano PTEN presentavano unicamente una deplezione di cellule staminali. La delezione di PTEN determinava l'attivazione di Akt e mTOR. La somministrazione di rapamicicina, un potente e specifico inibitore di mTOR, a topi con delezione di PTEN non solo eliminava le CSL e manteneva i topi in salute, ma impediva anche che si verificasse l'esaurimento delle CSE PTEN "null". Queste ultime garantivano una ricostituzione dell'ematopoiesi a lungo termine finché ai topi veniva somministrata la rapamicicina. Questa osservazione indica che gli effetti della delezione di PTEN erano in parte mediati dall'attivazione di mTOR e l'inibizione di quest'ultimo eliminava la CSL risparmiando le CSE normali. È stato osservato che la rapamicicina era anche capace di eliminare la chemioresistenza di tumori che sovra-esprimevano Akt, una serina treonina kinasi, ma non riusciva a svolgere tale effetto se il sistema apoptotico era danneggiato. Tuttavia, la somministrazione di doxorubicina insieme alla rapamicicina ripristinava l'efficacia di quest'ultima determinando un periodo di remissione relativamente lungo (Wendel et al., 2004). La rapamicicina non era neppure efficace nelle LAM che mostravano l'attivazione di NF-κB, ma anche in queste la combinazione dell'inibitore di mTOR con un inibitore di NF-κB permetteva di ottenere remissioni relativamente lunghe. È stato recentemente osservato che anche il Panobinostat in combinazione con il bortezomib era capace di inibire Akt e NF-κB modulando l'espressione di diverse molecole coinvolte nell'apoptosi e nel metabolismo di vari farmaci tra cui le caspasi, XIAP, Bcl-2 and MRP1 (Jiang et al., 2012).

Meccanismi di quiescenza estrinseci dipendenti dal microambiente

Tie2/Angiopoietina 1

È stato osservato che gli osteoblasti e le cellule staminali mesenchimali sono le principali fonti di angiopoietina 1 che è il ligando di Tie2 espresso dalle CSE. Il complesso così formatosi fa sì che quest'ultima esprima la beta-1 integrina e la N-caderina necessarie per il legame al microambiente midollare. In questo modo viene salvaguardata la quiescenza e la sopravvivenza della CSE. È stato osservato che in un modello immunocompetente di topo la leucemia causava una riduzione degli osteoblasti, delle cellule osteopontina positiva, e dell'osteocalcina con demineralizzazione dell'osso. Viceversa, il numero di osteoclasti era solo modestamente aumentato e la loro inibizione riduceva solo parzialmente la perdita di osso. Dati in vitro avevano suggerito che questi effetti potessero essere causati da una citokina che la successiva analisi molecolare aveva identificato in CCL3 visto che la concentrazione di mRNA codificante per questa citokina era aumentata nelle cellule leucemiche (Frisch et al., 2012). Inoltre nelle LAM che sovra-esprimono EVI1 l'espressione di angiopoietina 1 è aumentata. La via di segnale Ang1/Tie2

mantiene la cellula nella fase G0/G1 del ciclo cellulare grazie ad una sovraespressione di p18 rendendola resistente alla chemioterapia (Ichihara et al., 2011). Inoltre dopo trapianto allogenico la presenza di elevate concentrazioni della forma solubile di Tie2 si correlavano con una franca leucemia, con la percentuale di blasti midollari ed aveva un impatto prognostico sfavorevole (Koenecke et al., 2010).

TGFβ e BMP

Una deregolazione di TGFβ può alterare l'emopoiesi favorendo lo sviluppo di una LAM che molto raramente presenta una mutazioni dei geni SMAD, bersaglio di TGFβ. Di solito un'alterata risposta a TGFβ può dipendere o da un'alterata trascrizione come avviene nelle LAM con t(8;21), in cui la proteina di fusione AML1/ETO blocca la trascrizione dei geni bersaglio SMAD o dall'alterata espressione di geni bersaglio di TGFβ come quelli che regolano il ciclo cellulare c-Myc, p15 and p21. È stato recentemente osservato che il TGFβ prodotta dalle cellule staminali mesenchimali alterava la funzionalità delle cellule natural killer e dei linfociti T citotossici perché riduceva l'espressione del recettore "natural killer group 2 member D (NKG2D)" presente sulla superficie di queste cellule ed impediva la migrazione delle cellule mononucleate del sangue periferico verso le cellule leucemiche perché riduceva l'espressione di CCL5 e CXCL12. Questa immunosoppressione garantiva la protezione delle cellule leucemiche e impediva lo sviluppo di una graft-versus-leukemia (GVL) dopo un trapianto allogenico (Zhao et al., 2012).

Thrombopoietina

Nel topo la mancanza di trombopoietina o del suo recettore MPL determinano la perdita di quiescenza della CSE ed il suo progressivo esaurimento. Non vi sono dati che indicano come la produzione di questo fattore di crescita da parte del microambiente possa favorire una ricaduta leucemica tardiva.

Il ruolo di *N-caderina*, *integrine*, *osteopontina* e della via di segnale *Wnt/β-catenina* nel determinare possibili ricadute leucemiche tardive verrà esaminato nel paragrafo dedicato alle interazioni tra CSL e microambiente midollare.

Bibliografia

1. Ando K, Tsushima H, Matsuo E, et al. Mutations in the nucleolar phosphoprotein, nucleophosmin, promote the expression of the oncogenic transcription factor MEF/ELF4 in leukemia cells and potentiates transformation. *Biol Chem.* 2013 Feb 7.
2. Asai T, Liu Y, Di Giandomenico S, et al. Necdin, a p53 target gene, regulates the quiescence and response to genotoxic stress of hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood.* 2012; 120: 1601-1612.
3. Chen C, Liu Y, Liu R, et al. TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *J Exp Med.* 2008; 205: 2397-2408.
4. Fabre C, Carvalho G, Tasdemir E, et al. NF-kappaB inhibition sensitizes to

- starvation-induced cell death in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2007; 26: 4071-4083.
5. Frisch BJ, Ashton JM, Xing L, et al. Functional inhibition of osteoblastic cells in an in vivo mouse model of myeloid leukemia. *Blood*. 2012; 119: 540-550.
 6. Glaser SP, Lee EF, Trounson E, Bouillet P, Wei A, Fairlie WD, et al. Anti-apoptotic Mcl-1 is essential for the development and sustained growth of acute myeloid leukemia. *Genes Dev*. 2012; 26: 120-125.
 7. Grosjean-Raillard J, Tailler M, Adès L, et al. ATM mediates constitutive NF-kappaB activation in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2009; 28: 1099-1109.
 8. Guzman ML, Rossi RM, Neelakantan S, et al. An orally bioavailable parthenolide analog selectively eradicates acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood*. 2007; 110: 4427-4435.
 9. Ichihara E, Kaneda K, Saito Y, Yamakawa N, Morishita K. Angiopoietin1 contributes to the maintenance of cell quiescence in EVI1(high) leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 416: 239-245.
 10. Ito K, Bernardi R, Morotti A, et al. PML targeting eradicates quiescent leukemia-initiating cells. *Nature*. 2008; 453: 1072-1078.
 11. Jiang XJ, Huang KK, Yang M, Qiao, et al. Synergistic effect of panobinostat and bortezomib on chemoresistant acute myelogenous leukemia cells via AKT and NF-kB pathways. *Cancer Letter*. 2012; 326: 135-142.
 12. Koenecke C, Kümpers P, Lukasz A, et al. Shedding of the endothelial receptor tyrosine kinase Tie2 correlates with leukemic blast burden and outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for AML. *Ann Hematol*. 2010; 89: 459-467.
 13. Konopleva M, Contractor R, Tsao T, et al. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2006; 10: 375-388.
 14. Konopleva M, Milella M, Ruvolo P, et al. MEK inhibition enhances ABT-737-induced leukemia cell apoptosis via prevention of ERK-activated MCL-1 induction and modulation of MCL-1/BIM complex. *Leukemia*. 2012; 26: 778-787.
 15. Lafontaine J, Tchakarska G, Rodier F, Mes-Masson AM. Necdin modulates proliferative cell survival of human cells in response to radiation-induced genotoxic stress. *BMC Cancer*. 2012; 12: 234.
 16. Lagadinou ED, Sach A, Callahan K, et al. BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. *Cell Stem Cell*. 2013 Jan 15.
 17. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994; 367: 645-648.
 18. Medeiros BC, Minden MD, Schuh AC, et al. Characteristics and outcomes of acute myelogenous leukemia patients with very late relapse (>5 years). *Leuk Lymphoma*. 2007; 48: 65-71.
 19. Misaghian M, Ligresti G, Steelman LS, et al. Targeting the leukemic stem cell: the Holy Grail of Leukemia therapy. *Leukemia* 2009; 23: 25-42.

20. Rahmani M, Aust MM, Attkisson E, et al. Dual Inhibition of Bcl-2 and Bcl-xL strikingly enhances PI3K inhibition-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells through a GSK3- and bim-dependent mechanism. *Cancer Res.* 2013 Feb 7.
21. Rahmani M, Aust MM, Attkisson E, et al. Inhibition of Bcl-2 antiapoptotic members by obatoclax potently enhances sorafenib-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells through a Bim-dependent process. *Blood.* 2012; 119: 6089-6098.
22. Saha MN, Micallef J, Qiu L, Chang H. Pharmacological activation of the p53 pathway in haematological malignancies. *J Clin Pathol.* 2010; 63: 204-209.
23. Tamburini J, Elie C, Bardet V, et al. Constitutive phosphoinositide 3-kinase/ Akt activation represents a favorable prognostic factor in de novo acute myelogenous leukemia patients. *Blood.* 2007; 110: 1025-1028.
24. Tergaonkar V, Pando M, Vafa O, et al. p53 stabilization is decreased upon NFkappaB activation: a role for NFkappaB in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell.* 2002; 1: 493-503.
25. Thompson BJ, Jankovic V, Gao J, et al. Control of hematopoietic stem cell quiescence by the E3 ubiquitin ligase Fbw7. *J Exp Med.* 2008; 205: 1395-1408.
26. Valdez BC, Li Y, Murray D, Champlin RE, Andersson BS. The synergistic cytotoxicity of clofarabine, fludarabine and busulfan in AML cells involves ATM pathway activation and chromatin remodeling. *Biochem Pharmacol.* 2011; 81: 222-232.
27. Verma D, Kantarjian H, Faderl S, et al. Late relapses in acute myeloid leukemia: analysis of characteristics and outcome. *Leuk Lymphoma.* 2010; 51: 778-782.
28. Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS, et al. Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature.* 2004; 428: 332-337.
29. Wu ZH, Shi Y, Tibbetts RS, et al. Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science.* 2006; 311: 1141-1146.
30. Yilmaz OH, Valdez R, Theisen BK, et al. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature.* 2006; 441: 475-482.
31. Zhang Q, Lu H. Nutlin's two roads toward apoptosis. *Cancer Biol Ther.* 2010; 10: 79-81.
32. Zhao ZG, Cao Z, Xu W, et al. Immune protection function of multipotent mesenchymal stromal cells: role of transforming growth factor-b1. *Cancer Invest.* 2012; 30: 646-656.

Le nicchie midollari dopo trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche

Francesco Frassoni

Laboratorio Cellule Staminali Postnatali e Terapie Cellulari, Istituto Giannina Gaslini, Genova

Il trapianto di cellule ematopoietiche è divenuto una terapia standard per molte malattie. Il suo successo poggia sulla capacità delle cellule di colonizzare il sistema ematopoietico, sul numero ridondante di cellule staminali ematopoietiche (HSC).

L'homing di queste cellule è assicurato da interazioni tra HSC e microambiente anche se l'efficienza di questa interazione è tutt'altro che chiara.

Va chiarito subito, che il trapianto non è previsto in natura. Pertanto, nell'evoluzione, non sono stati previsti affinamenti per migliorare l'homing di una infusione relativamente massiva di HSC nel sangue periferico. Come possiamo spiegare che il trapianto di HSC è molto più efficiente di quello d'organo? La possibilità che le HSC abbiano la capacità di colonizzare il sistema ematopoietico deriva dal fatto che esse hanno acquisito l'abitudine di viaggiare. Le HSC nascono probabilmente nella sede definita AortaGonadeMesonefro (AGM) alla fine della quarta settimana di gestazione, e cominciano a viaggiare per soffermarsi poi nel fegato e nella milza e raggiungono il midollo osseo solo dopo il terzo mese quando i vasi entrano nelle ossa trasformando appunto la cartilagine in osso trabecolare. Essendo il tessuto ematopoietico distribuito in molte sedi molto distanti l'una dall'altra, è probabile che esista un meccanismo di omeostasi che preveda un'omogenea distribuzione delle HSC. È evidente che una piccola quota di HSC è reperibile nel sangue circolante.

Migrazione e homing

Il successo del trapianto di HSC dipende da un efficiente "homing" nel midollo del ricevente. Subito dopo l'infusione, le HSC devono trovare il modo di arrivare al midollo, di insediarsi all'interno della nicchia e lì rimanere. Il processo di homing dura poche ore e prevede l'adesione delle cellule alle pareti venose, la migrazione attraverso l'endotelio dei microvasi e la localizzazione in punti specifici del midollo osseo. Anche questa migrazione è guidata da meccanismi molecolari; è stato infatti descritto un gradiente che spinge o attrae le HSC verso le nicchie del midollo osseo. Quello che viene comunemente chiamato "attecchimento" in-

vece, è caratterizzato, oltre che dall'insediamento, da processi di proliferazione e differenziamento che hanno il loro fine ultimo nella ricostituzione emopoietica. Benchè i meccanismi di homing non siano ancora chiaramente definiti, molte evidenze scientifiche suggeriscono che essi includano l'azione coordinata di citochine, molecole di adesione ed enzimi proteolitici. Ecco alcuni tra i principali meccanismi molecolari:

- CXCR4/SDF-1: la neutralizzazione di CXCR4 tramite anticorpi o la de-sensibilizzazione tramite alte dosi di SDF-1 inibisce l'homing delle cellule CD34+ umane nel midollo di topi NOD/SCID, mentre l'over-espressione di CXCR4 migliora significativamente il processo.
- CD44: antigene espresso sulle cellule CD34 umane, è necessario per l'adesione all'acido ialuronico e all'osteopontina, espressi sia dalle pareti dei vasi che dall'endostio; infatti bloccando il suo recettore, si inibisce l'homing delle cellule CD34+ (vedi Lapidot T et al. Blood 2005)

I protocolli clinici di trapianto prevedono un condizionamento del ricevente con TBI o agenti che danneggiano il DNA, i quali causano un elevato aumento dei livelli di SDF-1 nel midollo per 1-2 giorni, che provvedono condizioni appropriate di homing efficiente delle cellule che montano CXCR4. D'altra parte, l'espressione di CXCR4 può essere up-regolata da una pre-stimolazione ex-vivo delle cellule CD34+ con SCF, FLT3ligando IL-6 e HGF.

Le HSC infuse e, quando passano nei sinusoidi del midollo osseo, "sentono" un gradiente di SDF-1 che li "attira" a passare dai vasi agli spazi midollari dove, almeno alcune HSC, si insediano delle nicchie ematopoietiche. Tuttavia, molte delle HSC infuse, non arrivano a destinazione dato che si è calcolato che (almeno nel modello murino) meno del 10% si installano nel midollo osseo. La descrizione che abbiamo fin qui fatto è molto sommaria ma sufficiente a formulare numerose domande.

In che stato si trova la nicchia ematopoietica dopo la malattia (prenderemo come esempio classico la leucemia) e dopo la terapia con irradiazione o farmaci citotossici? Delle cellule che compongono la nicchia abbiamo informazioni consistenti solo sulle cellule mesenchimali (MSC). Sappiamo che le MSC sono molto ridotte dopo il trapianto. Eppure il trapianto riesce.

Non riusciamo a sapere se la nicchia post-trapianto è la stessa che nel soggetto normale. Non sembra che le MSC derivino dal donatore e quindi il midollo che arriva non sembra contribuire al rinnovamento o irrobustimento della nicchia. Infatti, le poche MSC che ritroviamo sono di origine del ricevente e restano tali anche ad anni di distanza dal trapianto.

Non possiamo però escludere che le MSC del donatore non si trasformino in osteoblasti anch'essi cellule molto importanti della nicchia.

L'origine del concetto di nicchia ematopoietica

Nella sua formulazione originale Ray Schofield (Blood Cells, 1978) immaginò l'esistenza della nicchia per spiegare il declino della potenzialità proliferativa delle cellule trapiantate nel loro insieme. Come mai se si trapiantavano numeri costanti

di cellule di midollo osseo in topi irradiati (dopo che avevano completamente ripristinato la funzione ematopoietica) al quarto passaggio non c'era attecchimento? La nicchia fu immaginata come un luogo statico e preciso dove le HSC si andavano a sistemare. Poiché il riempimento delle nicchie era random non tutte le nicchie venivano occupate da HSC ma anche da cellule senza grande potenzialità staminale; e le HSC che non si insediavano nella nicchia perdevano l'essenza della staminalità. A lungo andare il sistema si esauriva. Il modello era molto più semplice rispetto a quello che possiamo intravedere oggi con tutte le interazioni tra citokine e recettori. La teoria di Schofield introduceva però un altro concetto fondamentale: la HSC è tale se sta nella nicchia che serve appunto a preservarne la staminalità. Va aggiunto, per completezza filologica, che l'ipotesi della nicchia ematopoietica forse non sarebbe mai stata formulata se nello stesso laboratorio in cui lavorava Schofield non fosse stato messo in evidenza che le HSC (allora chiamate operazionalmente CFU-S) non avevano una distribuzione random ma erano molto più frequenti nella zona vicina all'endo-ostio (nello shaft femorale del topo). In coda a questo richiamo filologico, dobbiamo chiederci, alla luce dell'evoluzione delle conoscenze dal 1978 ad oggi, quali sono gli elementi cellulari essenziali delle nicchie, se il numero delle nicchie può aumentare, e infine se esse possono essere permanentemente danneggiate.

Un problema: attecchimento non vuol dire funzionamento

Ci si potrebbe porre la seguente domanda: se la stragrande maggioranza dei trapianti attecchiscono perché ci preoccupiamo di questo problema? Molti potrebbero arguire che i "veri" problemi di attecchimento sono quelli legati all'incompatibilità del sistema MHC nel topo e HLA nell'uomo. Certamente un'incompatibilità HLA ostacola l'attecchimento ed il rigetto rappresenta un esempio classico di impedimento su basi immunologiche dell'insediamento e della funzione ematopoietica. È bene però riflettere sul fatto che non sappiamo molto di questi meccanismi. Infatti, prendiamo ad esempio un caso in cui un paziente dopo trapianto allogenico arriva a $500 \text{ PMN} \times 10^9/\text{L}$ e poi torna a zero e i suoi parametri ematologici non risalgono più. Generalmente, si dice che il trapianto è stato rigettato. Immaginando questo come un attacco vero e proprio delle cellule del sistema immune che eliminano le HSC del donatore. Questo avviene certamente in alcuni casi ma, spesso, gli eventi sono più complessi. Infatti, la non-funzione del sistema ematopoietico trapiantato non è sempre dovuta alla perdita delle HSC.

Nel caso della leucemia acuta, ad esempio, quando facciamo un aspirato midollare spesso non troviamo cellule ematopoietiche "normali", né loro progenitori. Eppure dopo chemioterapia esse saltano fuori e, proliferando, danno origine a quella che comunemente chiamiamo remissione. Il secondo esempio è dato dal trapianto ed è analogo da precedente. Dopo DLI ritorna a proliferare l'ematopoiesi "normale" del donatore. In entrambi i casi si può dire che le HSC erano sopresse ma questo non ci spiega molto. Il terzo esempio è più convincente. Il trapianto di due unità cordonali sviluppato dal gruppo di Minneapolis ha avuto un certo seguito anche se non ha risolto i problemi della velocità di attecchimento soprattutto delle

piastrine. C'è un'aspetto che è particolarmente interessante. Quando si trapiantano due diverse unità cordonali, dopo circa 100 giorni, nella maggioranza dei casi, si trovano cellule del sangue provenienti da una sola delle due unità. Le cellule derivanti dall'altra sembrano sparite. Molti hanno ritenuto che ci fosse una sorta di battaglia tra le due unità (battaglia con armi immunologiche). Probabilmente non è così. Infatti, se si verifica la ricaduta leucemica, e il paziente riceve una nuova chemioterapia, durante la rigenerazione ematologica si possono ritrovare cellule mature provenienti da entrambe le unità originariamente trapiantate. Questa è la prova che ci sono HSC che sono presenti ma non funzionanti e che solo in determinate condizioni esse riprendono a funzionare. Purtroppo in condizioni di fisiologia non abbiamo la possibilità di valutare che frazione di HSC rispetto alla totalità, funziona contemporaneamente in un certo periodo della vita. È probabile che la nicchia abbia un ruolo nel determinare quanto descritto; ma non ne conosciamo i meccanismi.

Quando arrivano le HSC trapiantate, le nicchie hanno subito molti sconvolgimenti

Quando si sviluppa la leucemia immaginiamo che una parte delle nicchie siano occupate dalle cellule staminali leucemiche. (Lapidot T et al. *Cell Stem Cell*, 2007; Lane S et al. *Blood* 2009). Alcune rimangono occupate da HSC normali; infatti, dopo chemioterapia, le cellule normali proliferano rapidamente e danno origine alla remissione. Se la avviene la ricaduta, diventa progressivamente più difficile re-indurre la remissione. Sappiamo che i sub-cloni leucemici selezionano HSC più resistenti e forse anche con maggiore capacità staminale (Ding L et al., *Nature*, 2012) ma non sappiamo che tipo di competizione per l'occupazione delle nicchie ci sia tra HSC normali e leucemiche. Tuttavia è molto probabile che dopo TBI (e conseguente riduzione di circa 3-4 log di cellule) e trapianto, le HSC del donatore si insedino stabilmente; ciò è provato dal fatto che se la malattia ricade, la eventuale nuova remissione è sostenuta dalla ematopoiesi del donatore. Non è compito di questo capitolo proseguire nella dissezione della nicchia leucemica. Si deve comunque concludere che, nel setting trapiantologico, nelle nicchie c'è un gran traffico.

La ematopoiesi post-trapianto

Abbiamo detto che le poche MSC che ritroviamo dopo trapianto allogenico sono di origine del ricevente e restano tali anche ad anni di distanza dal trapianto. Sembra quindi che "le HSC del donatore vadano ad abitare nella casa del ricevente". Il fatto che la frequenza delle MSC nel midollo di un trapiantato sia molto diminuita rispetto al soggetto normale tende a farci ritenere che la ematopoiesi "funziona" anche con una componente importante della nicchia numericamente molto ridotta. Non si riscontrano anomalie della funzione ematopoietica post-trapianto; la produzione di globuli rossi, piastrine e neutrofili è normale per tutto il resto della vita. Tuttavia, mentre la ricostituzione dei progenitori committed dopo qualche

anno torna a livelli fisiologici, quella delle cellule più immature (LTC-IC) rimane indefinitamente deficitaria nel soggetto adulto (Podestà M et al. Blood 1996). Si è pensato per lungo tempo che le HSC del donatore esaurissero la loro potenzialità proliferativa. Questo derivava appunto dal deficit di LTC e, nel modello murino, dallo studio dei trapianti seriali (Ogden DA, Micklem HS. Transplantation, 1976; Harrison DE, Astle CM. J Exp Med 1982). Questa interpretazione è stata messa in dubbio. (Iscove NN, Nawa K. Current Biology, 1997; Frassoni F et al, Blood 2003). Infatti, nei bambini trapiantati con cellule di cordone ombelicale si ottiene una ricostituzione delle LTC post-trapianto quasi a livelli normali; cosa che non avviene se i bambini sono trapiantati con midollo osseo. Non sappiamo ancora bene come stiano le cose nel trapianto di cordone in adulti. Inoltre, nei bambini una qualche presenza di MSC del donatore si è trovata. Da questo quadro, ancora molto confuso, si evincono due elementi che giocano un ruolo nel ripristino delle potenzialità di self-renewal delle HSC:

- l'età delle HSC (cordone vs midollo adulto);
- l'età del microambiente.

Il midollo trapiantato ha fretta: nuove nicchie devono rendersi disponibili

Ogni giorno il nostro sistema ematopoietico deve produrre 10^{11} RBC e un numero equivalente di PMN. Questo si compie perché c'è un esercito sterminato di cellule in corso di maturazione che ha alle sue spalle un enorme numero di progenitori in attività.

Se noi facciamo una PET ad un uomo adulto troveremo che (Sambuceti GM et al. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2012) il midollo osseo nella sua globalità ha un volume di 1632 ± 587 ml. Il midollo attivo (red BM) è di circa 541 ± 195 ml, a maggior prevalenza nelle ossa assiali rispetto alle appendicolari. Perché riportiamo questi dati? Intanto è probabile che una "fetta" importante di questo volume entri ogni giorno nel sangue. Questo dato globale rende meglio di ogni altro l'idea dello sforzo quotidiano dell'ematopoiesi. Ma, elemento ancora più importante, lo spazio midollare del paziente trapiantato occupato da midollo attivo (red BM) è molto più grande di quello di un soggetto normale (Frassoni & Sambuceti in preparazione). Quindi il trapianto induce il sistema ematopoietico attivo ad estendere la sua area che va ad occupare quasi tutto lo spazio disponibile. Da queste osservazioni, due sono le conclusioni che possiamo trarre:

- Per produrre più cellule non si riesce ad intensificare la produzione nelle aree comunemente già in funzione;
- Nuove nicchie devono essere reclutate. Tuttavia, non sappiamo se il sistema ematopoietico trapiantato si porta i "mattoni" per nuova casa, oppure se resuscita e riattiva nicchie precedentemente abbandonate.

Diverse sedi per l'ematopoiesi: nicchie diverse?

Ci sono però alcuni elementi assolutamente non chiari. Negli ultimi 30 anni ci siamo abituati a considerare la nicchia ematopoietica come essenziale per la so-

pravvivenza e funzione del sistema. Le HSC nascono, probabilmente, nell'area definita come AGM e subito cominciano a viaggiare; sono quindi abituate a sopravvivere anche fuori dalla nicchia. Almeno per qualche tempo. Il fatto che lo sviluppo del sistema ematopoietico preveda la migrazione delle HSC in varie sedi (AGM → Fegato → Milza → Midollo Osseo) ci insegna che le HSC abitano in diverse case. Esiste in tutte queste sedi una componente micro-ambientale comune? Oppure a diversi momenti dello sviluppo corrispondono necessità diverse per le HSC?

Non va infatti dimenticato che non c'è un sito fisso per la ematopoiesi nei vertebrati. Nel pesce il sito è il rene, nelle rane il fegato, negli uccelli e nei mammiferi il midollo osseo.

Il grande ricercatore T Lapidot ed il suo gruppo hanno suggerito che le nicchie vengano continuamente rimodellate.

Esiste infine un esempio che ci suggerisce di pensare che la nicchia sia un'entità piuttosto variabile. In un particolare tipo di rana (*Rana Temporaria*) l'ematopoiesi si sposta dal fegato al midollo osseo secondo la stagione.

Si sa poco sulla natura e sulle proprietà della nicchia per quanto riguarda l'emopoiesi embrionale: per esempio, non sappiamo quanto le diverse proprietà attribuite alle cellule embrionali, fetali ed adulte siano dovute alle rispettive nicchie e quali fattori entrino in gioco. Studi sulle cellule staminali germinali (testicoli e ovaio) di *Drosophila* hanno sviluppato un modello applicabile a nicchie di altri tessuti. In particolare, nell'ovaio di *Drosophila*, la cellula "hub" si lega ad una cellula staminale e ne regola il self-renewal e la differenziazione modulando l'espressione delle proteine morfogenetiche (BMP); nei testicoli, la cellula "hub" apicale controlla il self-renewal della cellula germinale adiacente (rev Morrison et al. Cell 2008). Quindi, per analogia con gli organi riproduttivi di *Drosophila*, i ricercatori hanno ipotizzato una cellula "hub" del microambiente che regoli e mantenga la riserva delle cellule staminali emopoietiche.

Poiché nei vertebrati il sito dell'emopoiesi cambia durante lo sviluppo, anche la natura della nicchia può cambiare. La nicchia dell'adulto è stata molto studiata. I topi mutanti in cui l'espressione di BMP sia stata silenziata, hanno un aumentato numero di osteoblasti e cellule staminali (Calvi et al. Nature 2003, Zhang et al. Nature 2003). Questi dati suggeriscono che gli osteoblasti possono rappresentare una componente critica della nicchia midollare: la microscopia intra-vitale ha infatti dimostrato che le cellule staminali sembrano risiedere nella regione periostale dell'osso trabecolare. Se noi marchiamo con GFP o LacZ le cellule staminali emopoietiche e poi le trapiantiamo nel topo esse si collocano in prossimità degli osteoblasti dove sono prodotti molti fattori, inclusi i ligandi per i recettori di Notch (Kumano et al. Immunity 2003) ed N-caderina il cui ruolo, come mediatore delle interazioni tra osteoblasti e HSC è stata stabilito. Inoltre, studi recenti suggeriscono che le HSC sono mantenute in uno stato quiescente tramite interazioni con gli osteoblasti che producono trombopoietina (Yoshihara et al. Cell Stem Cell 2007). La nozione che le HSC si mantengano nella nicchia in prossimità degli osteoblasti è associata da altri studi che pongono le HSC adiacenti alle cellule vascolari. La chemochina CXCL12 regola la migrazione delle HSC verso le cellule vascolari

(nicchia vascolare) (Kiel et al. *Immunity* 2006). Presi tutti insieme questi risultati suggeriscono che le HSC risiedono in vari siti all'interno del midollo e che la loro funzione potrebbe dipendere dalla loro precisa localizzazione: tuttavia le nicchie osteoblastiche e vascolari potrebbero essere interdipendenti e non fisicamente separate; oppure, le HSC potrebbero risiedere in regioni distinte che esercitano su di esse attività diverse. Le dinamiche cellulari all'interno della nicchia sono rilevanti per il trapianto; per esempio, scoperte recenti suggeriscono che la clearance delle cellule staminali dell'ospite anticorpo-mediata facilita l'occupazione della nicchia da parte delle HSC del donatore e quindi il loro attecchimento (Czechowicz et al. *Science* 2007).

Le informazioni che abbiamo provengono quasi tutte da studi su modelli animali. Questo ha consentito enormi progressi; ma nell'uomo abbiamo poche informazioni. Le HSC nei topi vecchi mostrano differente self-renewal e pattern of gene expression rispetto ad animali giovani. (D Rossi: *Cell*, 2008) e sembrano meno efficienti nelle loro capacità di homing. Sarebbe quindi importante stabilire le modificazioni che l'età apporta alla nicchia ematopoietica. In questo contesto va osservato che la modellistica del topo, che vive 3 anni non necessariamente riflette quella umana.

In conclusione, la nicchia ematopoietica rimane qualcosa di ancora largamente inesplorato: si conoscono solo alcune delle sue componenti cellulari: cellule endoteliali, mesenchimali e osteoblasti, però solo delle MSC si hanno informazioni dettagliate. Poco si sa delle interazioni tra cellule e componenti extracellulari ed è disponibile scarsa modellistica in vitro ed in vivo. Si aggiunga che nel trapianto (che come ricordato spesso segue ad una patologia neoplastica) le componenti della nicchia che conosciamo sono estremamente ridotte e danneggiate. Eppure l'ematopoiesi s'insedia e funziona.

Ma non ci accontentiamo. Conoscere i meccanismi della nicchia vorrebbe dire sapere espandere le HSC, come farle uscire da ciclo ecc. Ma non è semplice disegnare esperimenti adeguati. Nel frattempo informazioni indirette derivanti dall'interazione tra HSC di diverse età (cellule cordonali vs midollo adulto) e diverse età del microambiente (del ricevente) potranno fornire nuovi elementi utili a utilizzare meglio le HSC per nuove strategie terapeutiche.

Il microambiente midollare nella patogenesi del mieloma multiplo

Paolo Milani, Giampaolo Merlini

Centro per lo Studio delle Amiloidosi, Servizio di Analisi chimico Cliniche,
IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Le plasmacellule mielomatose dipendono strettamente dal microambiente midollare per la loro sopravvivenza e per la progressione della malattia¹. Il microambiente midollare consiste di una “nicchia” (*niche*) composta dalla matrice extracellulare e dalle cellule stromali comprendenti fibroblasti, osteoblasti, osteoclasti, cellule endoteliali e linfociti. Il dialogo fra le cellule mielomatose e la nicchia

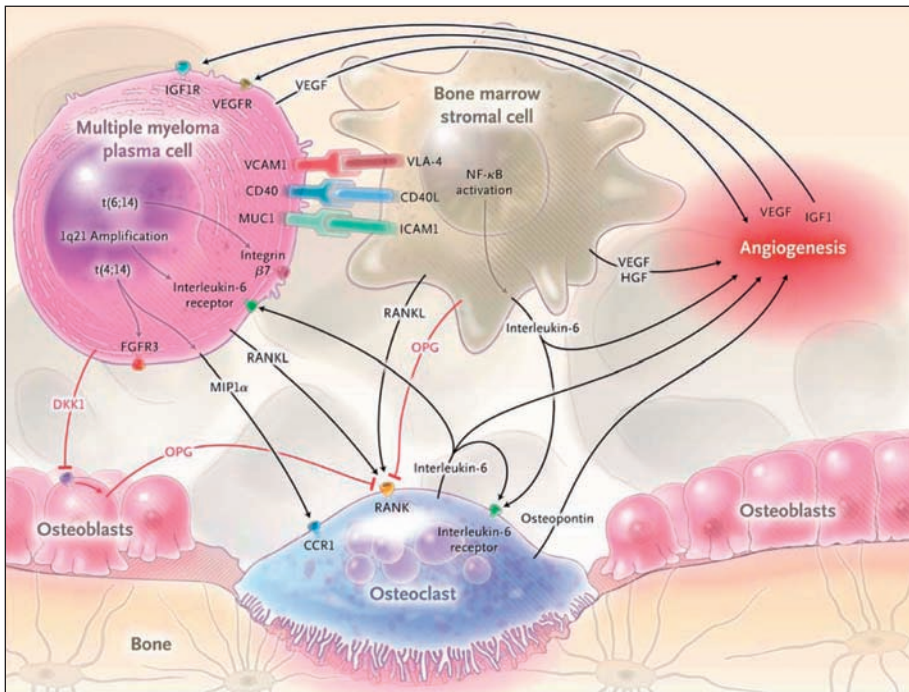


Fig. 1 - Interazioni fra le plasmacellule e il microambiente midollare nel mieloma multiplo (da Palumbo & Anderson, *N Engl J Med.* 2011; 364: 1046-1060).

midollare è mediato da fattori solubili (citochine) e da molecole di adesione². Le plasmacellule midollari e le cellule costituenti la nicchia midollare sono in grado di secernere numerosi fattori tra i quali, interleuchina-6 (IL-6), *insulin-growth-factor 1* (IGF1), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *B-cell activating factor* (BAFF), *fibroblast growth factor* (FGF), *stroma derived growth factor- α* (SDF1 α) e *tumor necrosis factor- α* (TNF- α)³⁻⁷. Questi fattori hanno molteplici ruoli regolatori sulle cellule mielomatose e la loro interazione con le proteine della matrice extracellulare. Da queste interazioni si generano segnali che permettono la crescita, la sopravvivenza, la resistenza farmacologica e la migrazione della cellula mielomatosa e partecipano allo sviluppo di neo-angiogenesi e delle lesioni osteolitiche^{8,9} (Fig. 1). Recentemente è stata evidenziata eterogeneità intraclonale con sub-cloni che competono, in modo evolutivo Darwiniano in base a mutazioni somatiche, per la occupazione della nicchia midollare¹⁰. Le dinamiche della evoluzione clonale nel tempo sono assai complesse e sta ora emergendo la loro rilevanza nel disegno della strategia terapeutica¹¹⁻¹³.

Il processo di *homing*

Uno dei momenti fondamentali nella patogenesi del mieloma multiplo è costituito dal passaggio delle plasmacellule dal centro germinativo del tessuto linfonodale al midollo osseo, e tale processo è definito *homing*. Gli eventi oncogenetici che si sviluppano a livello della nicchia midollare permettono poi la crescita, la sopravvivenza e la proliferazione di queste cellule⁹. Il processo di *homing* della cellula mielomatosa è mediato da SDF1 α che interagisce con il recettore CXCR4 sulla membrana della cellula mielomatosa. SDF1 α induce la motilità, l'internalizzazione del recettore CXCR4 e il riarrangiamento del citoscheletro della cellula tumorale. Inibitori specifici del CXCR4 sono in grado di bloccare in vitro l'interazione con SDF1 α e interferire con l'*homing* cellulare. Inoltre, è stato riconosciuto il ruolo fondamentale di alcune altre molecole di adesione nel processo di *homing* cellulare, CD44, *very late antigen* (VLA4), *leucocyte function-associated antigen 1* (LFA1), *neuronal adhesion molecule* (NCAM), *intercellular adhesion molecule* (ICAM1)¹⁴.

Interazione tra le cellule della matrice del midollo osseo (*Bone Marrow Stromal Cells*, BMSCs) e le cellule mielomatose

L'interazione delle cellule mielomatose con le BMSCs stimola la cascata del segnale mediata dal *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) e la secrezione di citochine quali l'IL-6. La liberazione di IL-6 stimola la liberazione di VEGF da parte delle cellule mielomatose. Questa interazione favorisce la crescita, la sopravvivenza, la resistenza agli agenti farmacologici e la possibilità di migrazione delle cellule mielomatose^{6,15}. La cascata di segnale legata all'NF- κ B media anche l'espressione di diverse molecole di adesione sia sulle cellule mielomatose che a livello delle BMSCs¹⁶. L'interazione delle plasmacellule mielomatose con il microambiente midollare attiva fattori favorenti la proliferazione cellulare e il sistema anti-

apoptotico. Molti dei fattori di crescita rilasciati dalle cellule mielomatose e dalle BMSCs stimolano l'osteoclastogenesi (IL6, IL1, VEGF, SDF1 α , *macrophage inflammatory protein 1 α* (MIP1 α)) e l'angiogenesi (VEGF, *basic-fibroblast growth factor* (bFGF), *angiopoietin 1* (Ang-1), *transforming growth factor* (TGF)- β , *platelet-derived growth factor* (PDGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), IL1)¹⁷.

Interazione tra le cellule endoteliali midollari e le cellule mielomatose

Uno studio comparativo dell'espressione genica delle cellule endoteliali di mieloma e di MGUS ha messo in evidenza il ruolo di tali cellule nei meccanismi che governano la proliferazione maligna delle cellule mielomatose¹⁸. Al termine del processo di *homing*, infatti, l'adesione delle cellule mielomatose è possibile grazie alla liberazione di citochine che facilitano l'angiogenesi. Grazie a tale processo, è favorita la crescita delle cellule mielomatose tramite un aumentato apporto di ossigeno e di nutrienti e una migliore rimozione di cataboliti. La liberazione di fattori di crescita quali il VEGF e l'IL-8, che sono secreti dalle BMSCs, permette di reclutare nuovi vasi sanguigni^{19,20}. Le cellule endoteliali neoformate supportano quelle tumorali tramite citochine e interazioni dirette. I processi autocrini e paracrini che si generano, favoriscono la proliferazione delle cellule mielomatose attraverso la liberazione dei principali fattori di crescita VEGF, bFGF, Ang-1, TGF- β , PDGF, HGF e IL-1².

Interazione tra le cellule mielomatose e gli osteoclasti

L'abituale bilancio tra la neo-formazione ossea e il riassorbimento osteoclastico è sovvertito in molti casi di mieloma multiplo determinando lo sviluppo di lesioni osteolitiche²¹. Molti sono i fattori implicati nell'attivazione osteoclastica, tra questi il ligando di NF-kB (RANKL), la proteina macrofagica 1a (MIP-1a), l'IL-3 e l'IL-6²². RANKL appartiene alla famiglia dei *tumor necrosis factor* ed ha un ruolo fondamentale nello sviluppo delle lesioni litiche. RANK è il recettore trans-membrana espresso dagli osteoclasti che al quale si lega RANKL. La interazione delle cellule mielomatose con le BMSCs determina la liberazione di un'elevata concentrazione di RANKL. L'associazione ligando-recettore genera la differenziazione cellulare del precursore degli osteoclasti tramite il sistema delle chinasi Jun e NF-kB²³. È stato dimostrato anche il ruolo di RANKL nell'inibizione dell'apoptosi osteoclastica²⁴. Il blocco di RANKL in modelli animali, permette il controllo non solo delle lesioni litiche ma anche della crescita tumorale²⁵. L'osteoprotegerina (OPG) è una molecola prodotta fisiologicamente dalle BMSCs che inibisce l'azione di RANKL fungendo da recettore "decoy". L'equilibrio tra RANKL e OPG è alla base del fisiologico rimodellamento osseo. L'interazione tra le BMSCs e le cellule mielomatose porta alla diminuzione della produzione di OPG, con conseguente aumento del legame di RANKL al suo recettore che si traduce in una maggiore attività osteoclastica^{24,26}. È stato sviluppato un anticorpo monoclonale specifico nei confronti del ligando RANKL (denosumab) che inibisce selettivamente l'interazione RANK-RANKL, con un effetto simile all'OPG.

Studi clinici di fase I/II hanno dimostrato l'efficacia del denosumab nel bloccare la formazione di lesioni litiche²⁷.

Un altro importante fattore nell'interazione osteoclasti-cellule mielomatose è l'IL-3. La concentrazione di IL-3 è aumentata nel midollo di pazienti affetti da mieloma rispetto ai controlli. L'IL-3 a concentrazioni comparabili con quelle riscontrate nei pazienti, favorisce la formazione di osteoclasti in colture cellulari di midollo osseo. Al contrario, la formazione di osteoclasti in linee cellulari di mieloma può essere arrestata tramite il blocco dell'IL-3²⁸. Gli osteoclasti infine sono in grado di produrre fattori di crescita ad azione pro-angiogenetica come l'osteopontina²⁹.

Interazione tra gli osteoblasti e le cellule mielomatose

La riduzione dell'attività osteoblastica favorisce lo sviluppo di lesioni litiche. La formazione e la differenziazione degli osteoblasti è resa possibile dal fattore di trascrizione RUNX2^{30,31}. Il legame del fattore VLA4 delle cellule mielomatose al fattore VCAM1 degli osteoblasti ha un effetto di down-regolazione dell'attività di RUNX2. Fattori solubili espressi dalle cellule tumorali, come Dickkopf 1 (DKK1) e l'IL3, possono contribuire all'effetto inibitorio delle cellule mielomatose sull'attività osteoblastica. Studi in vitro mostrano come elevate concentrazioni di DKK1 inibiscano la differenziazione degli osteoblasti. Elevati livelli di DKK1 nel midollo osseo o nel sangue periferico sono associati a lesioni osteolitiche nei pazienti con mieloma multiplo³². Alcuni studi hanno inoltre dimostrato come il blocco di DKK1, per mezzo di un anticorpo neutralizzante, prevenga la formazione di lesioni ossee e sia associato ad una minore crescita delle cellule tumorali³³. DKK1 ha infatti la capacità di aumentare l'espressione di RANKL e ridurre quella di OPG negli osteoblasti con un conseguente aumento della attività osteoclastica³⁴. Per quanto riguarda l'IL-3, oltre ad avere un effetto sugli osteoclasti ha un effetto di soppressione sulla differenziazione degli osteoblasti ed aumenta l'attività soppressiva di MIP-1 α e di TNF- α su tali cellule²⁸. È stato dimostrato che linee cellulari da pazienti affetti da mieloma con elevati livelli di IL-3 presentano un'inibizione dell'attività osteoblastica, ed al contrario, un'inibizione di IL-3 favorisce la loro riattivazione³⁵. L'IL-7 è un altro potenziale inibitore dell'attivazione osteoblastica. In pazienti affetti da mieloma sono presenti elevate concentrazioni di IL-7 ed in studi in vitro tale citochina ha la capacità di inibire l'attivazione dei precursori osteoblastici con azione dose dipendente. IL-7 è inoltre in grado di inibire l'azione di RUNX2, fattore di trascrizione degli osteoblasti³⁶.

Ruolo di NOTCH nella biologia delle cellule mielomatose

Notch è una famiglia di proteine transmembrana che agiscono sia da recettori sia da fattori di trascrizione. Sono note quattro isoforme di Notch¹⁻⁴ e due classi di ligandi Notch, Jagged1-2 e DII-1/3/4. Numerose evidenze sperimentali dimostrano che il sistema Notch gioca un ruolo rilevante nella patogenesi del mieloma multiplo, sia agendo direttamente sulle cellule mielomatose che sul microambiente

midollare³⁷. L'attivazione di Notch nelle plasmacellule maligne può avvenire in due modi, attraverso la contemporanea espressione di Notch1-3 e dei loro ligandi Jagged1-2, con conseguente attivazione autonoma attraverso interazioni omotipiche, oppure l'attivazione di Notch può essere provocata dalle BMSCs esprimenti ligandi DII o Jagged³⁷. Gli effetti della attivazione del sistema Notch sulla patogenesi mielomatosa sono numerosi e di grande rilevanza e riguardano l'adesione, la migrazione, l'angiogenesi, la farmacoresistenza, il riassorbimento osseo e l'"escape" dai meccanismi di immunosorveglianza. In considerazione della importanza di questa via di attivazione si stanno sviluppando strategie anti-Notch per la terapia del mieloma multiplo con lo scopo di superare la farmacoresistenza, ridurre la massa tumorale, diminuire la distruzione ossea e migliorare la risposta immunitaria.

Conclusioni

Nella patogenesi del mieloma multiplo ha un ruolo fondamentale l'interazione tra le cellule mielomatose e il microambiente midollare. La migliore comprensione dei sistemi di interazione tra BMSCs e le plasmacellule neoplastiche permette oggi di effettuare studi pre-clinici volti a individuare specifici approcci terapeutici che possano non solo avere effetto sul clone mielomatoso ma anche sul microambiente midollare, al fine di arrestare la progressione della malattia. I cosiddetti "nuovi farmaci" hanno come obiettivo principale l'interazione fra la cellula mielomatosa e il microambiente midollare distruggendo le vie di segnale che supportano la crescita, la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule mielomatose. L'inibizione del proteasoma stimola numerose vie apoptotiche, inclusa l'induzione della "endoplasmic reticulum stress response", e attraverso l'inibizione della via di segnale NF- κ B, down-regola i fattori angiogenetici, il segnale citochinico e l'adesione cellulare nel microambiente midollare. Inoltre, gli inibitori del proteasoma favoriscono la neoformazione ossea³⁸⁻⁴¹. I farmaci immunomodulatori (IMiDs) come la talidomide, lenalidomide e pomalidomide svolgono una azione anti-mieloma attraverso la modulazione del microambiente midollare stimolando l'apoptosi, inibendo l'angiogenesi, l'adesione e il circuito citochinico; stimolano inoltre la risposta immunitaria contro le cellule mielomatose mediata dalle cellule T ed NK⁴².

Bibliografia

1. Tricot G. New insights into role of microenvironment in multiple myeloma. *Lancet*. 2000; 355: 248-250.
2. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7: 585-598.
3. Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8: 915-928.
4. De Bruyne E, Bos TJ, Schuit F, et al. IGF-1 suppresses Bim expression in mul-

- multiple myeloma via epigenetic and posttranslational mechanisms. *Blood*. 2010; 115: 2430-2440.
5. Hideshima T, Catley L, Yasui H, et al. Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood*. 2006; 107: 4053-4062.
 6. Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, et al. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood*. 1996; 87: 1104-1112.
 7. Chauhan D, Li G, Hideshima T, et al. Blockade of ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 enhances anti-myeloma activity of Bortezomib/Proteasome inhibitor PS-341. *Oncogene*. 2004; 23: 3597-3602.
 8. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood*. 2004; 104: 607-618.
 9. Ghobrial IM. Myeloma as a model for the process of metastasis: implications for therapy. *Blood*. 2012; 120: 20-30.
 10. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12: 335-348.
 11. Walker BA, Wardell CP, Melchor L, et al. Intraclonal heterogeneity and distinct molecular mechanisms characterize the development of t(4;14) and t(11;14) myeloma. *Blood*. 2012; 120: 1077-1086.
 12. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*. 2012; 120: 1067-1076.
 13. Egan JB, Shi CX, Tembe W, et al. Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. *Blood*. 2012; 120: 1060-1066.
 14. Alsayed Y, Ngo H, Runnels J, et al. Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood*. 2007; 109: 2708-2717.
 15. Kumar S, Witzig TE, Timm M, et al. Expression of VEGF and its receptors by myeloma cells. *Leukemia*. 2003; 17: 2025-2031.
 16. Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Anderson KC. The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene*. 2001; 20: 4519-4527.
 17. Giuliani N, Storti P, Bolzoni M, Palma BD, Bonomini S. Angiogenesis and multiple myeloma. *Cancer Microenviron*. 2011; 4: 325-337.
 18. Ria R, Todoerti K, Berardi S, et al. Gene expression profiling of bone marrow endothelial cells in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2009; 15: 5369-5378.
 19. Gupta D, Treon SP, Shima Y, et al. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia*. 2001; 15: 1950-1961.
 20. Kline M, Donovan K, Wellik L, et al. Cytokine and chemokine profiles in multiple myeloma; significance of stromal interaction and correlation of IL-8 production with disease progression. *Leuk Res*. 2007; 31: 591-598.
 21. Bataille R, Chappard D, Marcelli C, et al. Mechanisms of bone destruction in

- multiple myeloma: the importance of an unbalanced process in determining the severity of lytic bone disease. *J Clin Oncol.* 1989; 7: 1909-1914.
22. Roodman GD. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Leukemia.* 2009; 23: 435-441.
 23. Ehrlich LA, Roodman GD. The role of immune cells and inflammatory cytokines in Paget's disease and multiple myeloma. *Immunol Rev.* 2005; 208: 252-266.
 24. Sezer O, Heider U, Zavrski I, Kuhne CA, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. *Blood.* 2003; 101: 2094-2098.
 25. Yaccoby S, Pearse RN, Johnson CL, Barlogie B, Choi Y, Epstein J. Myeloma interacts with the bone marrow microenvironment to induce osteoclastogenesis and is dependent on osteoclast activity. *Br J Haematol.* 2002; 116: 278-290.
 26. Giuliani N, Colla S, Rizzoli V. New insight in the mechanism of osteoclast activation and formation in multiple myeloma: focus on the receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL). *Exp Hematol.* 2004; 32: 685-691.
 27. Vij R, Horvath N, Spencer A, et al. An open-label, phase 2 trial of denosumab in the treatment of relapsed or plateau-phase multiple myeloma. *Am J Hematol.* 2009; 84: 650-656.
 28. Lee JW, Chung HY, Ehrlich LA, et al. IL-3 expression by myeloma cells increases both osteoclast formation and growth of myeloma cells. *Blood.* 2004; 103: 2308-2315.
 29. Tanaka Y, Abe M, Hiasa M, et al. Myeloma cell-osteoclast interaction enhances angiogenesis together with bone resorption: a role for vascular endothelial cell growth factor and osteopontin. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 816-823.
 30. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 1997; 89: 747-754.
 31. Giuliani N, Rizzoli V, Roodman GD. Multiple myeloma bone disease: pathophysiology of osteoblast inhibition. *Blood.* 2006; 108: 3992-3996.
 32. Tian E, Zhan F, Walker R, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2003; 349: 2483-2494.
 33. Yaccoby S, Ling W, Zhan F, Walker R, Barlogie B, Shaughnessy JD, Jr. Antibody-based inhibition of DKK1 suppresses tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth in vivo. *Blood.* 2007; 109: 2106-2111.
 34. Qiang YW, Chen Y, Stephens O, et al. Myeloma-derived Dickkopf-1 disrupts Wnt-regulated osteoprotegerin and RANKL production by osteoblasts: a potential mechanism underlying osteolytic bone lesions in multiple myeloma. *Blood.* 2008; 112: 196-207.
 35. Ehrlich LA, Chung HY, Ghobrial I, et al. IL-3 is a potential inhibitor of osteoblast differentiation in multiple myeloma. *Blood.* 2005; 106: 1407-1414.
 36. Giuliani N, Rizzoli V. Myeloma cells and bone marrow osteoblast interactions: role in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 2007; 48: 2323-2329.
 37. Colombo M, Mirandola L, Platonova N, et al. Notch-directed microenviron-

- ment reprogramming in myeloma: a single path to multiple outcomes. *Leukemia*. 2013 (in press).
38. Heider U, Kaiser M, Muller C, et al. Bortezomib increases osteoblast activity in myeloma patients irrespective of response to treatment. *Eur J Haematol*. 2006; 77: 233-238.
 39. Murray EJ, Bentley GV, Grisanti MS, Murray SS. The ubiquitin-proteasome system and cellular proliferation and regulation in osteoblastic cells. *Exp Cell Res*. 1998; 242: 460-469.
 40. Garrett IR, Chen D, Gutierrez G, et al. Selective inhibitors of the osteoblast proteasome stimulate bone formation in vivo and in vitro. *J Clin Invest*. 2003; 111: 1771-1782.
 41. Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4: 349-360.
 42. Quach H, Ritchie D, Stewart AK, et al. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma. *Leukemia*. 2010; 24: 22-32.

La fibrosi midollare nelle neoplasie mieloproliferative

Mario Cazzola

Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Pavia, e Dipartimento Oncoematologico, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Nella classificazione WHO dei tumori dei tessuti emopoietici e degli organi linfatici¹, le neoplasie mieloproliferative comprendono le seguenti condizioni:

- leucemia mieloide cronica *BCR-ABL1* positiva;
- leucemia neutrofilica cronica;
- trombocitemia essenziale;
- policitemia vera;
- mielofibrosi idiopatica o primaria;
- mastocitosi;
- neoplasie mieloproliferative non classificabili.

Tradizionalmente si considerano malattie o neoplasie mieloproliferative croniche Philadelphia positive la trombocitemia essenziale, la policitemia vera e la mielofibrosi primaria. La diagnosi, la definizione prognostica e l'approccio terapeutico a queste condizioni morbose sono state rivoluzionate negli ultimi otto anni dall'identificazione della loro base molecolare, in particolare dall'identificazione di mutazioni somatiche dei geni *JAK2* e *MPL*²⁻⁸.

I criteri diagnostici della classificazione WHO delle neoplasie mieloproliferative Philadelphia positive sono riportati nella tabella 1.

Evoluzione clinica delle neoplasie mieloproliferative Philadelphia negative

Tutte le neoplasie mieloproliferative possono evolvere in leucemia mieloide acuta: il rischio è maggiore per la mielofibrosi primaria rispetto alla trombocitemia essenziale ed alla policitemia vera.

La trombocitemia essenziale può evolvere in policitemia vera oppure in mielofibrosi post-trombocitemia essenziale. La policitemia vera può evolvere in mielofibrosi post-policitemia ed un fattore di rischio è un elevato carico mutazionale. Il meccanismo molecolare attraverso il quale si realizza un carico mutazionale elevato è riportato nella figura 1. Sostanzialmente, un ricombinazione mitotica in una cellula emopoietica che è eterozigote per la mutazione *JAK2* (V617F) determina perdita di eterozigosità del cromosoma 9p e genera una cellula figlia omozigote per *JAK2* (V617F).

Tab. 1 - Criteri diagnostici WHO delle neoplasie.

Neoplasia mieloproliferativa	Criteri diagnostici	Requisiti per la diagnosi e annotazioni
Trombocitemia essenziale	<ol style="list-style-type: none"> 1. conta piastrinica $\geq 450 \times 10^9/L$ mantenuta per tutto il periodo dell'approccio diagnostico; 2. alla biopsia ossea, numero aumentato di megacariociti, di grosse dimensioni, senza significative alterazioni delle linee eritroide e mielo-monocitica; 3. mancanza di criteri diagnostici di policitemia vera, mielofibrosi primaria, leucemia mieloide cronica <i>BCR-ABL1</i> positiva, sindrome mielodisplastica o altra neoplasia mieloide; 4. presenza della mutazione <i>JAK2</i> (V617F) e di un altro marcatore clonale, oppure, in assenza di <i>JAK2</i> (V617F), non evidenza di piastrinosi reattiva. 	<p>La diagnosi di trombocitemia essenziale richiede la presenza di tutti i 4 criteri.</p> <p>Il 60-70% dei pazienti con trombocitemia essenziale ha la mutazione <i>JAK2</i> (V617F). Un altro 5% ha mutazioni somatiche dell'esone 10 del gene <i>MPL</i>, che codifica per il recettore della trombopoietina.</p>
Policitemia vera	<p>Criteri maggiori:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. emoglobina $>18,5$ g/dL nei maschi o $>16,5$ g/dL nelle femmine, oppure evidenza di un aumento di almeno 2 g/dL rispetto ai valori basali con emoglobina >17 g/dL nei maschi o >15 g/dL nelle femmine; 2. presenza della mutazione <i>JAK2</i> (V617F) o di una mutazione somatica dell'esone 12 di <i>JAK2</i>. <p>Criteri minori:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. biopsia ossea con cellularità aumentata per l'età e proliferazione trilineare (panmielosi) 2. eritropoietina sierica inferiore all'ambito normale; 3. crescita di colonie eritroidi spontanee da cellule mononucleate del sangue periferico. 	<p>La diagnosi di policitemia vera richiede la presenza dei due criteri maggiori e di almeno uno minore, oppure di un criterio maggiore e di almeno due minori.</p> <p>Il 95% dei pazienti con policitemia vera ha la mutazione <i>JAK2</i> (V617F), e il rimanente 5% ha una mutazione somatica dell'esone 12 di <i>JAK2</i>.</p>
Mielofibrosi primaria	<p>Criteri maggiori:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. proliferazione di megacariociti atipici con evidenza di fibrosi, oppure, in assenza di fibrosi, presenza associata di proliferazione mieloide (granulocitica) con ipoplasia eritroide (tipica della mielofibrosi pre-fibrotica); 2. mancanza di criteri diagnostici di policitemia vera, leucemia mieloide cronica <i>BCR-ABL1</i> positiva, sindrome mielodisplastica o altra neoplasia mieloide; 3. presenza della mutazione <i>JAK2</i> (V617F) o di una mutazione somatica dell'esone 10 di <i>MPL</i> (residuo W515), oppure, in assenza di una mutazione somatica, esclusione di fibrosi midollare secondaria ad altre malattie. <p>Criteri minori:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. screezio granulo-eritroblastico; 2. livello sierico elevato di LDH; 3. anemia; 4. splenomegalia. 	<p>La diagnosi di mielofibrosi idiopatica richiede la presenza di tutti i 3 criteri maggiori e di almeno 2 criteri minori.</p> <p>Il 60-70% dei pazienti con mielofibrosi primaria ha la mutazione <i>JAK2</i> (V617F). Un altro 5-10% ha mutazioni somatiche dell'esone 10 del gene <i>MPL</i>, che codifica per il recettore della trombopoietina.</p>

Valutazione della fibrosi midollare

I criteri per la valutazione della fibrosi midollare sono stati definiti da esperti europei⁹ e sono i seguenti:

- grado 0: fibre reticoliniche lineari e sparse, senza intersezioni;
- grado 1: rete di reticolina a maglie larghe con molte intersezioni, specialmente in aree perivascolari;
- grado 2: aumento diffuso e denso delle fibre reticoliniche con marcate inter-

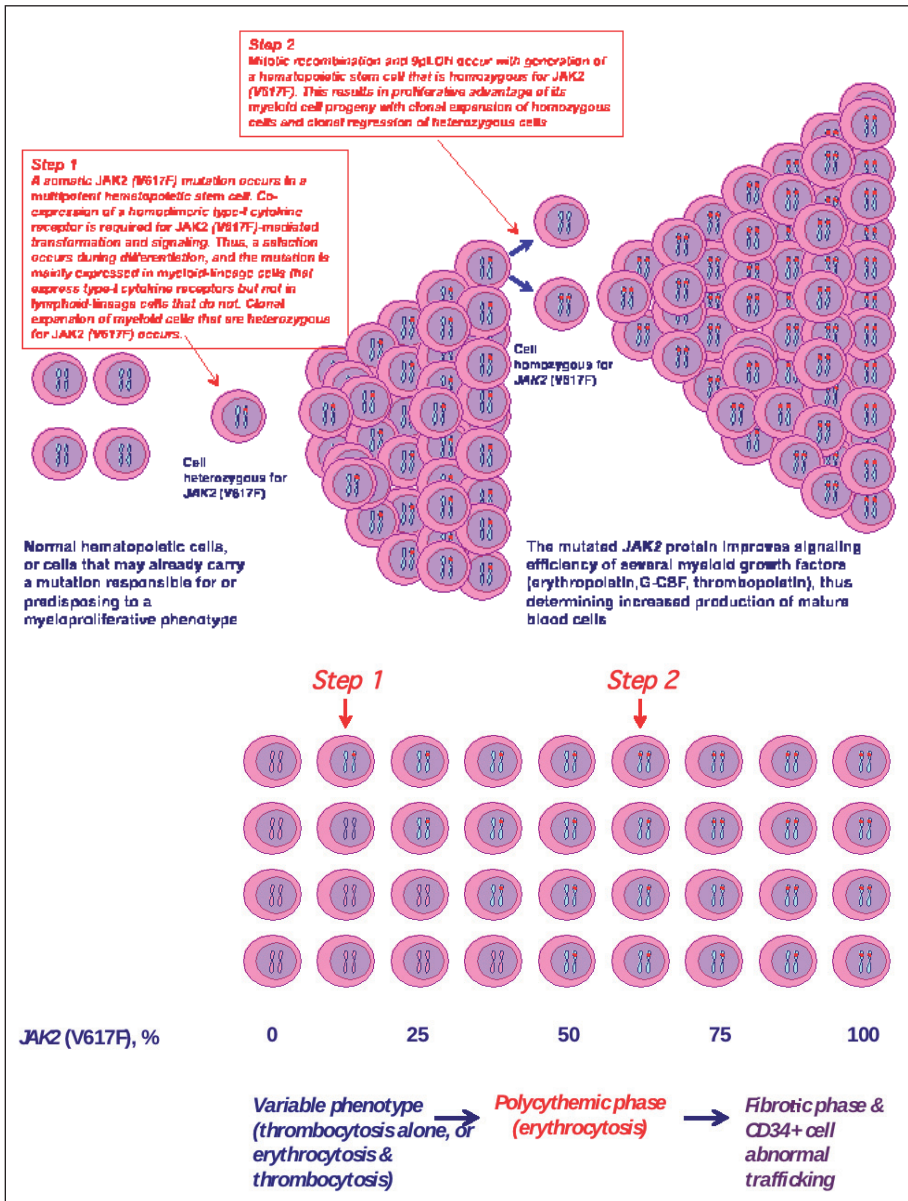


Fig. 1 - Modello dell'evoluzione clonale della policitemia vera e della relazione fra carico mutazionale e fenotipo clinico, inclusa la fibrosi midollare.

- sezioni, e occasionali fasci focali di collagene e/o aree focali di osteosclerosi;
- grado 3: aumento diffuso e denso delle fibre reticoliniche con marcate intersezioni, e con ampi fasci grossolani di collagene, spesso associati a netta osteosclerosi.

Ruolo centrale dei megacariociti nella patogenesi della fibrosi midollare

Numerose evidenze suggeriscono che i megacariociti svolgano un ruolo centrale nella patogenesi della fibrosi midollare nelle neoplasie mieloproliferative. I megacariociti di questi pazienti differenziano in modo abnorme¹⁰ e rilasciano fattori profibrotici^{11,12}.

Bibliografia

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC; 2008.
2. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005; 365: 1054-1061.
3. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005; 7 (4): 387-397.
4. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005; 352 (17): 1779-1790.
5. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005; 434: 1144-1148.
6. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006; 3: e270.
7. Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007; 356: 459-468.
8. Pietra D, Li S, Brisci A, et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008; 111: 1686-1689.
9. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 2005; 90: 1128-1132.
10. Balduini A, Badalucco S, Pugliano MT, et al. In vitro megakaryocyte differentiation and proplatelet formation in Ph-negative classical myeloproliferative neoplasms: distinct patterns in the different clinical phenotypes. *PLoS ONE*. 2011; 6: e21015.
11. Chagraoui H, Komura E, Tulliez M, Giraudier S, Vainchenker W, Wendling F. Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. *Blood*. 2002; 100: 3495-3503.
12. Ciurea SO, Merchant D, Mahmud N, et al. Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2007; 110: 986-993.

**MECCANISMI DELLA DIFFUSIONE
METASTATICA DEI TUMORI SOLIDI**

La diffusione metastatica: un aggiornamento istopatologico

Umberto Magrini

Già Professore Ordinario di Anatomia Patologica, Università di Pavia

Nell'eterogeneità del processo di metastatizzazione due quadri clinico-patologici con aspetti opposti si presentano all'attenzione del patologo e meritano, per recenti acquisizioni di ordine biologico, alcune note di aggiornamento. Le due situazioni sono rappresentate dai tumori a primitività occulta, in cui le metastasi sono al centro del quadro clinico in assenza di primitività dimostrabile, e dalla "recidiva tardiva", in cui le cellule neoplastiche metastatiche rimangono silenti per decenni dopo la diagnosi iniziale.

Le metastasi a primitività sconosciuta

Particolare interesse pratico e dottrinale riveste il problema delle metastasi a primitività sconosciuta, CUP (Cancer of Unknown Primary).

Si definiscono come CUP tumori metastatici dei quali, in base agli esami clinico-anamnestici, di laboratorio, di "imaging" (Eco, CT/FDG-PET), istopatologici, non è possibile identificare la primitività.

Questa sindrome, che rappresenta il 3-5% delle neoplasie ed occupa il 4° posto tra le cause di morte per tumore, è notevolmente eterogenea, in quanto, accanto alla maggior parte dei casi refrattari alle terapie, è presente una quota (15-20%) con migliore risposta terapeutica e più prolungate sopravvivenze.

La mediana di età alla diagnosi è di 60 anni, con lieve prevalenza maschile. Le sedi di metastatizzazione più frequenti sono il fegato, i polmoni, le ossa, i linfonodi. In più del 50% dei casi le sedi sono multiple. In meno del 20% viene individuata la primitività nel corso della malattia e nel 30% neanche l'indagine autopsica chiarisce il quesito. Quando le primitività emergono, polmone, pancreas, vie biliari, mammella, tiroide, prostata, colon-retto sono quelle più frequentemente riconosciute.

Fattori prognostici favorevoli sono correlati con: carcinoma scarsamente differenziato della linea mediana, adenocarcinoma papillare peritoneale (sesso femminile), adenocarcinoma in singolo linfonodo ascellare (sesso femminile), carcinoma squamoso in linfonodi latero-cervicali, adenopatia maligna isolata, carcinoma neuro-endocrino scarsamente differenziato, metastasi singola e asportabile.

Fattori prognostici sfavorevoli sono rappresentati da: metastasi epatica di adenocarcinoma, ascite neoplastica non papillare, metastasi multiple cerebrali, metastasi pleuro-polmonari, metastasi ossee sistemiche.

La mediana di sopravvivenza è di 4-12 mesi, con il 50% di sopravvivenza a un anno e il 10% a cinque anni dalla diagnosi.

Compito del patologo è applicare un algoritmo diagnostico volto a identificare la linea cellulare (epiteliale, mesenchimale, linfoide, germinale, melanocitaria) con marcatori immunoistochimici. Il panel di marcatori deve essere selezionato individualmente, tenendo conto dei dati clinici, sede di metastasi, sesso, età, quadro istologico.

La primitività può essere indicata nel 35-40% dei casi. Nei casi rimanenti il profilo immunoistochimico non è conclusivo e fornisce esclusivamente la possibilità di alcune diagnosi differenziali.

Si possono quindi identificare due gruppi in base alla possibile primitività, indicata o meno dalla immunoistochimica: i casi con profilo sede-specifico ed i casi che rimangono a fenotipo non definito.

Un profilo immunoistochimico definito, ad esempio di tipo colico (“colon cancer profile, CCP-CUP”), consente interventi terapeutici sede specifici, con risposte e decorso migliori rispetto ai casi di cui il profilo immunoistochimico non risulta specifico per una sede univoca.

Attualmente si sta sviluppando l'utilizzo di nuove tecnologie, predittive del tessuto di origine, quali i microarrays.

L'accuratezza diagnostica, cioè l'indicazione del possibile tessuto di origine, ottenuta con queste metodiche, nelle casistiche più recenti, è sempre superiore all'80%.

Utilizzando i dati derivati dal profilo molecolare, le terapie “sede specifiche” praticate hanno dato migliori sopravvivenze rispetto alle terapie empiriche usate precedentemente in assenza di una indicazione istogenetica definita (Hainsworth et al., 2013). Il punto cruciale sarà stabilire se i pazienti con CUP a possibile primitività individuata in base al genoma, rispondono in maniera sovrapponibile ai pazienti con metastasi a primitività nota, quando trattati con terapie sede-specifiche. Quali le possibili ipotesi in tema di biologia dei CUP? Che cosa induce la precoce diffusione metastatica con primitività occulta?

In prima istanza è prospettabile che i CUP rappresentino un gruppo eterogeneo di neoplasie che condividono una piccola sede di origine ed una precoce capacità metastatica.

Alternativamente è ipotizzabile che i CUP costituiscano un'entità distinta, con un assetto genetico specifico e alterazioni fenotipiche peculiari, tali da conferire precoce capacità di metastatizzazione in presenza di uno stato di “dormancy” della lesione primaria. A supporto di un'alterazione genotipica si inseriscono recenti analisi epidemiologiche (Hemminki et al., 2010) che documentano una concentrazione dei CUP in famiglie con carcinomi del rene, polmone e colo-rettali.

Sempre a supporto dei CUP come entità distinta, si inseriscono alcune osservazioni recenti riguardanti le vie molecolari coinvolte nel processo metastatico. È stata dimostrata, in metastasi di carcinomi squamosi a livello testa-collo, a primitività

ignota, l'espressione di proteine correlate con l'ipossia, con risvolti clinico-prognostici negativi (Koo e Kim, 2011) e, in una casistica di CUP, è stata riscontrata un'elevata frequenza di mutazioni dell'oncogene MET (Stella et al., 2011). Come noto, l'oncogene MET è un regolatore chiave di un programma genetico, definito "invasive growth signature", fisiologicamente attivo nello sviluppo embrionario e nella rigenerazione tissutale. MET codifica per un recettore tirosino-chinasico per lo "Scatter Factor", un sensore di condizioni microambientali avverse (ipossia, radiazioni) che condiziona, attraverso l'attivazione di un programma genetico, invasività, protezione da apoptosi, angiogenesi. Mentre mutazioni puntiformi sono rare (3-4%) nei tumori primitivi, la frequenza di mutazioni di MET nelle metastasi a primitività sconosciuta risulta elevata (15% vs. 1-3% della popolazione cancerosa generale), suggerendo che queste mutazioni, funzionalmente attive, possano rappresentare "markers" associati con CUP. Nello stesso tempo questi dati possono rappresentare una guida per una terapia personalizzata, basata sul genoma della cellula metastatica piuttosto che sul tessuto di origine.

Le cellule metastatiche quiescenti

La malattia neoplastica è oggi interpretata come risultante dell'interazione tra cellula cancerosa e microambiente. Le recenti acquisizioni in questo campo hanno fornito nuove interpretazioni in tema di sopravvivenza, espansione, invasività e quiescenza della cellula neoplastica. Gli spunti interpretativi riguardanti la "dormancy", condizionata dal "crosstalk" tra cellula cancerosa e nicchia metastatica, sono di particolare interesse, in quanto premessa per possibili spunti terapeutici. La situazione di "dormancy", comune a diversi tipi di cellula neoplastica, è stata approfondita sia clinicamente che sperimentalmente soprattutto per quanto riguarda il carcinoma mammario.

È di osservazione clinica non rara la comparsa di metastasi osteo-midollari di carcinoma mammario dopo decenni (5-25 anni) dalla diagnosi iniziale, il che implica una lunga sopravvivenza di cellule cancerose, di tipo staminale, disseminate in una fase precoce di malattia.

Le cellule cancerose disseminate stabiliscono il loro "homing" preferenziale in una nicchia osteo-midollare, all'interfaccia con il trabecolato osseo, per l'interazione tra i recettori CXCR4 e CXCR7, presenti sulle cellule neoplastiche e la chemochina CXCL12 (SDF) prodotta dalle cellule stromali.

In contiguità all'endostio si creano giunzioni ("gap junctions") tra cellule neoplastiche ed elementi stromali. È sperimentalmente dimostrato il passaggio attraverso queste giunzioni di alcuni tipi di microRNA con induzione della quiescenza (fase GO del ciclo cellulare) (Lim et al., 2011). Ne consegue un vantaggio di sopravvivenza in quanto il fenotipo "dormant" risulta resistente alle chemioterapie, che sono efficaci limitatamente a un "target" di cellule proliferanti.

Nel fenomeno "dormancy" sono implicate anche le cellule staminali mesenchimali (MSC) in quanto responsabili della produzione di cellule T-regolatorie. Queste ultime condizionano elusione dalla risposta immune, con conseguente "onco-protezione" nei riguardi delle cellule neoplastiche.

La deregolazione dei rapporti tra matrice extracellulare, stroma e cellula cancerosa porta a uno squilibrio tra fattori antiangiogenetici e fattori angiogenetici, con prevalenza di questi ultimi e innesco dello “switch” angiogenico che può promuovere il “risveglio”, vale a dire il passaggio da micrometastasi silenti a macrometastasi sintomatiche.

Appare evidente come la ricerca di base offra innumerevoli spunti per la elaborazione di strategie terapeutiche. Nel caso della “dormancy” delle cellule cancerose nella nicchia osteo-midollare, uno dei razionali terapeutici potrebbe essere rappresentato dal facilitare il rientro nel ciclo replicativo delle cellule in fase G1-G0, con conseguente sensibilità a farmaci citotossici.

Bibliografia

1. Hemminki K, et al. Familial risk in cancer of unknown primary: tracking the primary sites. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 435-440.
2. Koo J S, Kim H. Hypoxia - related protein expression and its clinicopathologic implication in carcinoma of unknown primary. *Tumour Biol.* 2011; 32: 893-904.
3. Lim PK, et al. Gap junction-mediated bone marrow import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells. *Cancer Research.* 2011; 71: 1550-1560.
4. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression (Review). *J Cell Biol.* 2012; 196: 395-406.
5. Peinado H, Lavotshkin S, Lyden D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts (Review). *Sem Cancer Biol.* 2011; 21: 139-146.
6. Reddy BY, et al. The microenvironmental effect in the progression, metastasis, and dormancy of breast cancer: a model system within bone marrow (Review). *Int J Breast Cancer* 2012.
7. Stella GM, et al. MET mutations in cancer of unknown primary origin (CUPs). *Hum Mutat.* 2011; 32: 44-50.
8. Stella GM, et al. Cancers of unknown primary origin: current perspectives and future therapeutic strategies (Review). *J Transl Med.* 2012.

Meccanismi della diffusione metastatica dei tumori solidi

Giannino Del Sal

Unità Operativa Oncologia Molecolare, Laboratorio Nazionale CIB (LNCIB),
Area Science Park, Università di Trieste

Oltre il 90% dei casi di morte per cancro è dovuto alle metastasi, non al tumore primario da cui queste lesioni maligne hanno origine.

Le metastasi, che rappresentano, dunque, l'aspetto più minaccioso delle malattie tumorali, sono il prodotto finale di una serie complessa di eventi biologici, di un processo a più stadi di invasione-metastatizzazione. Durante la progressione tumorale che porta alla formazione delle metastasi, infatti, le cellule cancerose prima abbandonano i siti primari di crescita come singole unità o in masse - (invasione locale, entrata nel circolo sanguigno), poi migrano verso altri distretti corporei (sopravvivenza all'interno del circolo sanguigno, arresto in prossimità dell'organo bersaglio, fuoriuscita dai vasi) e infine si adattano a sopravvivere e crescere nei diversi microambienti che incontrano nei tessuti che invadono (formazione delle micrometastasi, colonizzazione metastatica).

Molteplici vie di segnalazione sembrano giocare ruoli chiave nella progressione tumorale maligna e molte di queste sono attive in entrambi gli aspetti fondamentali dello sviluppo tumorale: la tumorigenesi e la metastatizzazione (un esempio è riportato in figura 1). Uno dei principali soppressori tumorali noti è la proteina p53, *hub* centrale dei circuiti molecolari che controllano il destino proliferativo o di morte delle cellule, in risposta a condizioni di stress come la presenza di danni al DNA o l'attivazione di oncogeni.

p53 è un fattore trascrizionale che lega una specifica sequenza di riconoscimento presente sul DNA di centinaia di geni diversi che, nelle suddette condizioni di stress, vengono differenzialmente attivati in base a svariati parametri.

Tra le più frequenti alterazioni genetiche riscontrate nei tumori umani si contano proprio quelle che colpiscono il gene soppressore tumorale TP53. In oltre il 50% dei casi di cancro nell'uomo, infatti, le funzioni di questo gene risultano compromesse a causa di mutazioni che portano alla sua inattivazione o alla produzione di una serie di proteine mutanti manifestanti nuovi attributi oncogenici.

Le modalità con cui questo gene soppressore tumorale viene inattivato nei tumori è singolare. In oltre l'80% dei casi, infatti, le alterazioni in TP53 non sono mutazioni *frame-shift* o non-senso, che porterebbero a una mancata sintesi della pro-

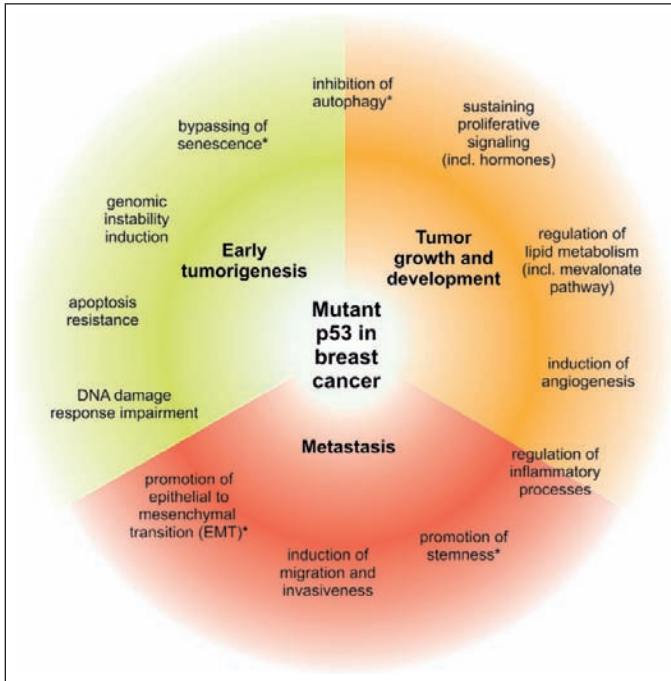


Fig. 1 - L'esempio del carcinoma mammario. Nel carcinoma mammario p53 mutata è implicata in molteplici processi biologici rilevanti per l'insorgenza e la progressione tumorale. Da Walerych D. et al. 2012.

teina o a sue forme tronche. Si tratta piuttosto di mutazioni missenso che hanno come conseguenza la produzione di proteine mutate a lunghezza intera, rilevabili in gran quantità all'interno dei nuclei delle cellule tumorali.

In condizioni normali, i livelli di p53 nella cellula vengono mantenuti bassi grazie all'azione dell'E3 ubiquitina-ligasi MDM2, che ne promuove la degradazione.

In condizioni di stress la p53 viene stabilizzata e funziona da potente attivatore dei programmi di senescenza cellulare e apoptosi.

È ben noto come la perdita o l'inibizione di p53 contribuisca in maniera significativa all'insorgenza di tumori a causa della conseguente incapacità della cellula di rispondere adeguatamente agli stress, ma emerge sempre più chiaramente come, nella situazione in cui l'attività di p53 sia compromessa o aberrante, altri processi legati alla progressione tumorale vengano influenzati.

Diverse evidenze, per esempio, mettono in relazione la perdita delle funzioni della proteina p53 con il processo di transizione epitelio-mesenchimale. Circa il 90% dei tumori ha origine dal tessuto epiteliale. Uno dei tratti distintivi delle cellule tumorali che intraprendono il percorso metastatico è proprio l'attivazione della transizione epitelio-mesenchimale, un programma biologico che normalmente svolge un ruolo molto importante durante la morfogenesi embrionale. La transizione epitelio-mesenchimale, che implica la dissoluzione delle giunzioni aderenti e la perdita della polarità cellulare, fa sì che le cellule si dissocino dal tessuto epiteliale d'origine, acquistando diversi attributi mesenchimali tra cui elevate capacità migratorie e d'invasività.

Vari studi attestano la capacità di p53 di controllare l'espressione di proteine del citoscheletro e della matrice extracellulare importanti per la motilità e di influenzare le vie di segnalazione che modulano la migrazione e le risposte chemiotattiche delle cellule.

Sempre la perdita delle funzioni della proteina p53 è stata associata all'acquisizione da parte delle cellule tumorali di caratteristiche staminali, che si ritiene siano responsabili dell'insorgenza del cancro, delle sue recidive e della chemioresistenza dei tumori più aggressivi.

La perdita di p53 è sicuramente un evento cruciale nello sviluppo e nella progressione tumorale, ma è l'espressione di suoi mutanti a essere in particolar modo associata alle forme più invasive e metastatiche di cancro, fatto che suggerisce sempre più fortemente come la p53 mutata non solo perda le sue funzioni di soppressore tumorale, ma acquisisca *de novo* funzioni pro-metastatiche.

Studi recenti, per esempio, hanno dimostrato come in cellule di carcinoma mammario la p53 mutata conferisca capacità migratorie e metastatiche in risposta ai segnali molecolari indotti da TGF- β (uno dei principali induttori della transizione epitelio-mesenchimale) e dall'attivazione di Ras.

In particolare, emerge chiaramente come p53 mutata si comporti da interruttore molecolare delle metastasi indotte da TGF- β , inibendo l'attività del soppressore delle metastasi p63 (attraverso la formazione di complessi a tre con le proteine Smad) e contribuendo così alla regolazione negativa dei geni antimetastatici bersaglio di p63.

Probabilmente, l'acquisizione di nuove funzioni da parte della p53 mutata si basa anche sulla capacità della proteina di formare complessi proteici aberranti coinvolgendo svariati partner, la cui attività ne risulta conseguentemente perturbata. E non solo.

Insieme all'enzima prolil-isomerasi Pin1 (normalmente un modulatore chiave di molteplici vie di segnalazione, ma anche amplificatore di segnali oncogenici nei tumori, dove si ritrova spesso espresso in maniera aberrante), per esempio, la p53 mutata è in grado di indurre uno specifico programma trascrizionale che promuove l'aggressività tumorale. Questo programma è stato messo in luce in cellule di carcinoma mammario, dove la firma molecolare dell'asse Pin1/p53 mutata è risultata avere valore prognostico, ma questo stesso programma genetico o elementi di esso potrebbero rivelarsi strumentali per lo sviluppo del potenziale metastatico anche in altri contesti tumorali.

Per la comprensione della progressione tumorale e per identificare precocemente i tumori ad alto rischio di disseminazione metastatica è fondamentale l'identificazione dei tratti distintivi che conferiscono a certe cellule tumorali un fenotipo aggressivo e capacità metastatiche.

Da questo punto di vista, i segnali molecolari dei circuiti di regolazione cellulare che si intersecano a livello della proteina p53 normale o mutata sono di particolare interesse e ancora non del tutto decifrati.

La caratterizzazione di questi aspetti della biologia tumorale offre la possibilità di individuare nuovi e più efficaci biomarcatori diagnostici e prognostici e di sviluppare terapie mirate, in particolare contro le forme tumorali più aggressive.

Bibliografia

1. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Rev Cancer*. 2002; 2: 563-572.
2. Collavin L, Lunardi A, Del Sal G. p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression. *Cell Death Differ*. 2010; 17, 901-911.
3. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Rev Cancer*. 2003; 3: 453-458.
4. Girardini JE, Napoli M, Piazza S, Rustighi A, Marotta C, Radaelli E, Capaci V, Jordan L, Quinlan P, Thompson A, Mano M, Rosato A, Crook T, Scanziani E, Means AR, Lozano G, Schneider C, Del Sal G. A Pin1/mutant p53 axis promotes aggressiveness in breast cancer. *Cancer Cell*. 2011; 20, 79-91.
5. Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 2006; 127: 679-695.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144: 646-674.
7. Sethi N, Kang Y. Unravelling the complexity of metastasis - molecular understanding and targeted therapies. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11: 735-748.
8. Soussi T. TP53 Mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Adv Cancer Res*. 2011; 110: 107-139.
9. Steeg PS, Theodorescu D. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*. 2006; 12: 895-904.
10. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009; 139: 871-890.
11. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011; 127: 275-292.
12. Walerych D, Napoli M, Collavin L, Del Sal G. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis*. 2012; 33: 2007-2011.

La transizione epitelio-mesenchimale: passaggio cruciale nel processo metastatico

Sergio Marchini

Unità di Genomica Traslazionale, Laboratorio di Farmacologia Antitumorale, Dipartimento di Oncologia; Istituto di Ricerche Farmacologiche “Mario Negri”, IRCCS, Milano

Negli organismi pluricellulari, la transizione epitelio-mesenchimale (EMT, dall'inglese “epithelial to mesenchymal transition”) è un processo fisiologico con un ruolo chiave, sia durante le fasi dello sviluppo embrionale (embriogenesi e/o organogenesi), sia nell'adulto dove coordina processi quali la riparazione dei tessuti danneggiati. Dati recenti riportati in letteratura stanno dimostrando come l'EMT abbia anche un ruolo patologico, in quanto l'anomala attivazione di meccanismi molecolari che regolano la EMT è stata identificata durante le fasi di trasformazione neoplastica e soprattutto nel processo metastatico. L'idea generale è che la progressione del tumore verso una forma sempre più aggressiva sia correlata con la perdita dell'identità epiteliale e l'acquisizione del fenotipo mesenchimale (Thiery e Sleeman, 2006; Lee et al., 2006).

L'EMT è un processo biologico reversibile, coordinato e gerarchicamente organizzato sul piano molecolare e morfologico, che porta alla disaggregazione degli epitelii e alla loro riorganizzazione in strutture morfologicamente distinte con fenotipo mesenchimale. Le principali caratteristiche delle cellule che vanno incontro a EMT sono:

- Aumento delle capacità migratorie.
- Invasività.
- Elevata resistenza all'apoptosi.

Le cellule epiteliali sono cellule altamente polarizzate con una forma geometrica precisa e connesse le une alle altre da giunzioni cellulari. Le cellule di fenotipo mesenchimale invece non stabiliscono contatti intercellulari, sono prive di polarità e dotate di movimento. Durante la EMT, le cellule epiteliali perdono le giunzioni intercellulari, con conseguente distacco dalle altre cellule circostanti. Nel caso del processo di metastatizzazione, le cellule neoplastiche, soprattutto quelle presenti al fronte invasivo del tumore primario, mostrano frequentemente una down-regolazione dei marcatori del fenotipo epiteliale e una perdita delle giunzioni intercellulari, risultando nella perdita di polarità tipica delle cellule epiteliali e in una ridotta adesività intercellulare necessaria per invadere la matrice extracellulare (ECM) e migrare lontano dal sito del tumore primario.

Dal punto di vista funzionale la EMT si può verificare in tre condizioni biologiche distinte con esiti funzionali differenti fra loro; è stata pertanto proposta una classificazione della EMT in tre diversi sottotipi a seconda del contesto biologico in cui essa si verifica e che prendono il nome di EMT di “Tipo 1”, “Tipo 2”, “Tipo 3” (Kalluri e Weinberg, 2009). Nel “Tipo 1”, la EMT è associata con le fasi dello sviluppo embrionale. Nel “Tipo 2” la EMT, è associata durante i processi di infiammazione tissutale con la rigenerazione dei tessuti danneggiati, mentre nel “Tipo 3”, il processo di EMT è associato alla progressione dei carcinomi e alla loro metastatizzazione. Sostanzialmente oggi l’EMT è riconosciuto come un meccanismo cardine per disperdere le cellule nell’embrione, riparare i tessuti danneggiati e contribuire al processo di invasività e metastasi dei tumori epiteliali. Dati sempre più solidi in letteratura sul ruolo dell’EMT nella progressione tumorale sottolineano come l’EMT sia coinvolta anche nella comparsa di resistenza all’apoptosi, all’anoikia e alla senescenza, nell’immuno-tolleranza e immuno-soppressione, alla farmaco resistenza conferendo infine proprietà staminali alle cellule tumorali stesse (dall’inglese CSC, *cancer stem cells*).

La conversione fenotipica che accompagna la EMT è il risultato di cambiamenti nella biochimica cellulare caratterizzati dall’attivazione di cascate del segnale che dalla superficie cellulare si irradiano al nucleo dove avviene l’attivazione di un preciso programma trascrizionale; dall’iper-espressione di molecole di superficie e dalla contemporanea internalizzazione di proteine di membrana (Kalluri and Neilson, 2003). Tutto ciò è spesso accompagnato da un’aumentata motilità cellulare (grazie alla formazione di pseudopodi e al rimodellamento del citoscheletro) e dall’espressione di marcatori mesenchimali quali la vimentina e la caderina N (Lang et al., 2002; Thiery, 2003). Viene aumentata l’espressione di proteine del citoscheletro, quali l’ α -SMA, la γ -actina, la β -filamina e la talina, e altre componenti della matrice extracellulare quali la fibronectina ed il collagene (LaGamba et al., 2005). L’aumento della sintesi delle metalloproteasi (MMPs,) permette alle cellule tumorali di invadere il microambiente circostante e di iniziare la colonizzazione a distanza.

Benchè il processo di EMT si configuri come un evento precoce importante nel processo di migrazione delle cellule tumorali, esistono ancora molti dubbi dal punto di vista sperimentale che questo fenomeno interessi tutte le cellule della massa tumorale e che sia condiviso tra tutti i tumori epiteliali. I tumori sono costituiti da una popolazione cellulare altamente eterogenea e molti carcinomi metastatici non sono sottoposti ad una completa transizione ad un fenotipo mesenchimale, ma possiedono ancora caratteristiche molecolari e morfologiche tipiche di un epitelio differenziato, con giunzioni epiteliali e polarità apicale-basolaterale intatta (Christiansen e Rajasekaran, 2006). È opinione largamente condivisa che cellule tumorali inizino una EMT “parziale” per poi revertire da mesenchimali a epiteliali nei siti di metastasi secondo un processo detto MET (transizione mesenchimale-epiteliale); infatti, questi tumori secondari nei siti distali mantengono le stesse caratteristiche istopatologiche del tumore primario, senza mostrare fenotipo mesenchimale (Kalluri e Weinberg, 2009). Queste evidenze mostrano che la transizione ad un fenotipo maligno aggressivo non è un evento “tutto o nulla”

(Christiansen e Rajasekaran, 2006). Per questo è oggi difficile poter delineare per tutti i tipi di tumore dei marcatori univoci di EMT. Generalmente si ritiene che le metastasi derivino da cellule di una neoplasia avanzata che hanno acquisito la capacità di invadere e disseminare. Studi recenti tuttavia indicano che il processo di EMT e la conseguente disseminazione di cellule neoplastiche possono avvenire in maniera continua dall'inizio dello sviluppo del tumore primitivo e non solamente in stadi avanzati come ad esempio nel tumore epiteliale dell'ovaio (EOC) che negli stadi III-IV è metastatico al suo esordio.

L'attivazione del processo EMT si verifica attraverso un'orchestrata serie di eventi che vedono coinvolte sia le cellule epiteliali sia le cellule che colonizzano il microambiente circostante quali cellule stromali, piastrine. La EMT è indotta da numerosi fattori spesso rilasciati dal microambiente stesso, tra cui fattori di crescita dei recettori tirosin chinasi, dalla via di segnalazione di Wnt, da quella di Notch, dalle MMP e dalla ipossia. L'induttore di EMT per eccellenza è il TGF- β , che svolge un ruolo fondamentale sia nei processi ontogenici che nella trasformazione neoplastica e convergono a livello citoplasmatico nella degradazione delle E-caderine, evento chiave associato alla distruzione delle giunzioni cellula-cellula. Possiamo indicativamente riconoscere 4 diversi meccanismi di regolazione dell'EMT:

- regolazione post trascrizionali.
- Controlli trascrizionali (SNAIL, TWIST, SLUG).
- Diversi meccanismi di splicing.
- Regolazione a livello degli RNA non codificanti (miR-200; miR-34; miR-101).

Il quadro molecolare fin qui descritto è reso ancora più complicato in alcune neoplasie, quali il EOC, in cui non solo non abbiamo ancora un chiaro modello che descriva, a partire dalla lesione primaria, le varie tappe della progressione tumorale, ma che presenta anche un processo di metastatizzazione particolare in quanto le metastasi si formano per "dispersione" nella cavità peritoneale e non per disseminazione ematica.

Come dicevamo prima, il EOC negli stadi avanzati (circa 180% delle diagnosi annue) si presenta già metastatico all'esordio con una iniziale sensibilità alla terapia al platino per poi progressivamente diventare resistente a qualunque linea terapeutica durante i cicli successivi dopo la ricomparsa della malattia. Il ruolo dell'EMT nell'eziopatogenesi del EOC è stata ampiamente discussa in letteratura in questi ultimi anni con risultati spesso non univoci. Dati pubblicati recentemente sembrano sottolineare come la presenza all'esordio della malattia di cellule tumorali con fenotipo mesenchimale sia da associarsi alla scarsa sensibilità alla prima linea di platino, e quindi alla prognosi. Studi genomici condotti su ampie casistiche di pazienti (TCGAtlas) hanno dimostrato come esista una serie di alterazioni molecolari ("signatures") spesso indipendenti dalla classificazione morfologico funzionale convenzionali (stadio, grado, isotipo) che richiamano al fenotipo mesenchimale e correlano con una prognosi peggiore.

Sfruttando una banca dei tessuti biologici di EOC costruita nell'arco degli ultimi 20 anni in collaborazione con l'ospedale San Gerardo di Monza, abbiamo sele-

zionato una coorte di campioni di tumore epiteliale dell'ovaio, stadio III-IV, di cui per uno stesso paziente era disponibile la biopsia all'esordio della malattia, cioè quando il tumore non era ancora stato trattato con la chemioterapia e costituito per la maggior parte da cellule sensibili al platino (abbreviato come PSO, Primary Surgery Ovary,) e dopo diversi cicli di terapia, quando il tumore ricompariva ed era costituito da cellule tumorali resistenti ad ogni trattamento convenzionale (abbreviato come SCR, Secondary Cyto-Reduction). L'analisi del profilo trascrizionale ha evidenziato un numero elevato di geni differenzialmente espressi tra SCR vs PSO e comune tra i dei pazienti analizzati. L'analisi dei pathway ha invece dimostrato che i geni analizzati afferivano per la maggior parte al pathway dell'attivazione del TGF β , della riorganizzazione della matrice extracellulare e della motilità cellulare. Visti nel loro insieme questi dati suggerivano che in almeno il 70% dei casi analizzati alla ricomparsa della malattia la popolazione tumorale fosse prevalentemente costituita da cellule non più di natura epiteliale ma altresì che avessero acquisito un fenotipo mesenchimale. Nel restante 30% non avevamo una modulazione del pathway. Vista la scarsità numerica della coorte entrata nello studio non era possibile fare alcuna valutazione statistica. Per questo abbiamo utilizzato un dataset indipendente di sole prime chirurgie per capire se geni coinvolti nella transizione EMT fossero correlati, all'esordio della malattia, alla sensibilità al platino. I dati ottenuti hanno mostrato che per alcuni di questi fosse possibile una associazione in univariata con la sopravvivenza e il tempo libero da malattia. In conclusione i dati sperimentali ottenuti e le osservazioni riportate in letteratura sia in modelli pre-clinici (i.e., in *vivo* e *in vitro*), sia su biopsie di pazienti, suggeriscono che tra i diversi fattori molecolari in grado di influenzare la prognosi e la risposta alla terapia nel EOC vi siano sicuramente i meccanismi che guidano la EMT. Da un punto di vista terapeutico queste osservazioni hanno un importante impatto sul disegno e la pianificazione dei futuri approcci terapeutici mirati ad un miglioramento dell'indice terapeutico. La natura reversibile del processo EMT, suggerisce che sia possibile associare le terapie convenzionali con agenti citotossici (sia bersaglio specifici che non) a nuovi composti in grado di revertire il fenotipo da mesenchimale a epiteliale.

Networks molecolari che regolano le metastasi tumorali

Massimo Zollo

CEINGE, Biotecnologie Avanzate, Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli

Negli ultimi anni la ricerca genetica molecolare in medicina nel campo della immunologia e dell'oncologia sperimentale ha fatto grossi passi in avanti nell'identificare e caratterizzare le diverse fasi della progressione cellulare da benigna a maligna, incluso la sua capacità di invadere un tessuto creando micro-macro metastasi creando l'habitat adatto alla loro crescita evadendo la funzione inibitoria del sistema immunitario.

Cosa si conosce oggi e quali sono le prossime fasi della ricerca in questa affascinante area della scienza medica in grado di generare grossi sviluppi nel campo farmacologico? Bene questi saranno i punti principali della mia presentazione.

Prima di affrontare cosa si sa, occorre fare un passo indietro e citare un grande scienziato la cui teoria oggi è ancora in auge nel campo dello studio delle metastasi tumorali Stephen Paget, che già nel 1890 comunicò l'esistenza della teoria "seed and soil" adesso rivisitata ma ancora utile nella genetica dei tumori ed oncologia medica¹. Cioè egli descrisse per primo che una cellula tumorale ha necessità di crearsi un ambiente tale da cui ricevere segnali tali che tutti coordinati insieme sono utili per la sua sopravvivenza e la sua rigenerazione in un particolare tessuto/organo. Bene, ad oggi tale ipotesi è ancora valida, ed è surrogata da dati validati in diversi sistemi tumorali noti in modelli animali e nell'uomo.

I ruoli funzionali di molti attori importanti coinvolti nella metastasi sono stati definiti in dettaglio negli ultimi anni, grazie al progetto del genoma umano ed alle sue scoperte associate che sono seguite negli anni. Di queste, la più importante direi, corrisponde allo studio patologico-funzionale nell'identificazione di alcune cellule che circondano il tumore (monociti, macrofagi, cellule killer naturali e fibroblasti). Queste sono diventate rilevanti grazie al loro modo di comunicare con la cellula tumorale, studiate adesso da diversi scienziati nel mondo con un pioniere italiano il prof. Alberto Mantovani ed il suo team che studia in particolare i macrofagi associati ai tumori (TAMs). In una "review" recentemente pubblicata dal mio gruppo di ricerca noi citiamo tutte queste cellule e la loro funzione-fisiologica nel microambiente tumorale² (Fig. 1). Inoltre diversi eventi genetici e fattori critici che definiscono il fenotipo metastatico saranno qui descritti e che sono parte della

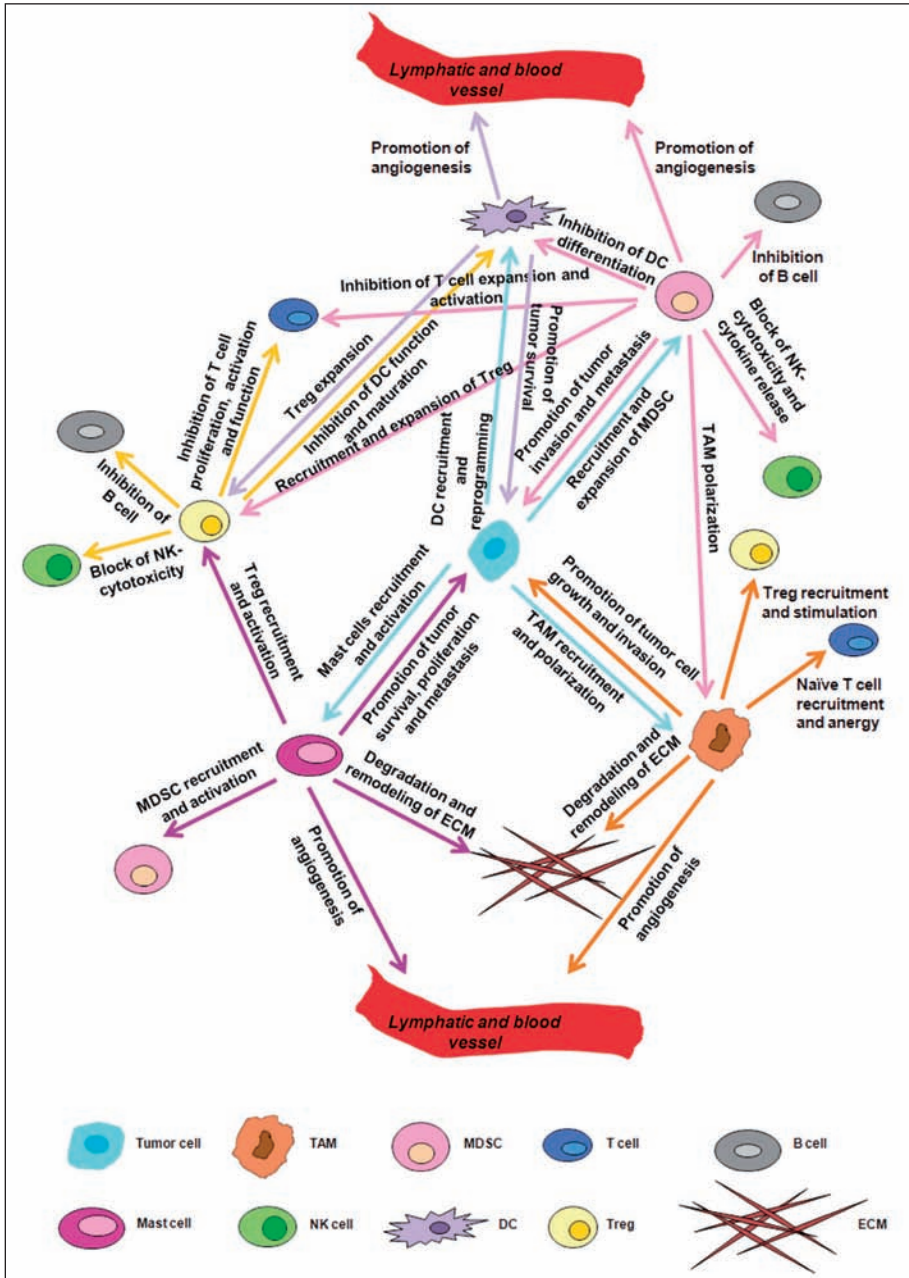


Fig. 1 - Il Microambiente tumorale. Sommario del network di comunicazioni tra cellula tumorale al centro e il microambiente tumorale che mostra le cellule immunitarie che popolano il tumore e le vie di comunicazione. ECM Matrice extra-cellulare; TAM macrofagi associati ai tumori, macrofagi; MDSC cellule mieloidi con funzione soppressoria; Myeloid-derived suppressor cell; T-reg Cellule T regolatorie; DC Cellule Dendriche Dendritic cell; NK Cellule Naturali killer. Da Springer, review, Spano and Zollo 2013 "Immunocell within tumor microenviroment", in press.

tumorigenesi dalla fase iniziale fino ad un fase progressiva e purtroppo letale. Ciò comporta la strutturazione di reti molecolari “networks” che promuovono la locale invasione delle cellule tumorali, le singole cellule in invasione, la formazione del microambiente metastatico dei tumori primari, la intravasione, la metastasi linfo-angiogeniche, l’extravasione, e la crescita metastatica, una review prodotta del mio gruppo di ricerca oggi riassume tali networks³.

Un ulteriore passo in avanti è stato fatto di recente grazie all’identificazione di alcuni microRNAs con importanti funzioni nel microambiente tumorale, RNA non codificanti, che in maniera “anti-senso” legandosi sul 3’ UTR di geni noti, hanno dimostrato di essere importanti fattori nel regolare negativamente l’espressione di geni/proteine target aumentandone il loro processo degradativo, una funzione nota oggi di grossa importanza nella carcinogenesi. Alcuni di questi miRNAs hanno avuto una importante definizione perché in grado di regolare proteine legate alle cellule tumorali staminali, cellule che sebbene in numero esiguo, sono presenti nel tumore in microambienti privi di ossigeno ed in grado, una volta espantate o migrate altrove in un nuovo organo, sono in grado di ricapitolare la progressione tumorale della cellula di partenza. Questa funzione è come se fossa presente nella memoria della cellula stessa, ecco perché chiamate cellule “staminali”, ma come capite bene, di staminale hanno solo la funzione di rigenerare il tumore in altro organo, del resto sono cellule già differenziate con un peculiare fenotipo oncologico trasformante. Uno studio pilota in tale senso è stato sviluppato da un gruppo pioniere presso l’università di Toronto (Canada), che ha definito il ruolo di tali cellule nel sistema nervoso centrale e glioma^{4,5} e di recente nel medulloblastoma (tumore del cervelletto) definendo il modo di isolare tali cellule positive a marcatori di membrana quali il CD133 e CD15. Tuttavia occorre dire che gli studi sulle cellule staminali di linee emapoietiche sono stati i veri pionieri anzi tempo a quelli mostrati nel cervello, trattasi dello studio delle leucemie umane dove il marcatore di predizione identificato era il CD34 positivo e successivamente le stesse cellule so state caratterizzate per essere CD38 negative. Ancora un altro esempio è il marcatore prominin o anche detto “CD133” nel colon retto carcinoma, il CD44 positivo/cd24 negativo nel carcinoma della mammella⁶ e così via, una serie di lavori scientifici recenti hanno portato alla definizione dei principali marcatori caratterizzanti tali cellule tumorali staminali organo/tessuto specifico. Il loro nome poi è stato cambiato in “cellule iniziatrici del tumore” (Tumor Initiating Cells). Come al solito, esiste un’altra faccia della medaglia, e questa corrisponde a recenti studi che sollevano questioni su questo modo di isolare queste cellule staminali tumorali. Proprio di recente un chiaro esempio di questo studio che ha criticato sia il metodo di “screening e di validazione” ma anche il suo l’isolamento con i marcatori di membrana è riportato da un gruppo di Shanghai in Cina, che ha definito la plasticità cellulare come esempio di modificazione della fisiologia di tali cellule⁷.

Esempi di lavori prodotti dal mio gruppo di ricerca sono stati indirizzati nell’identificazione della funzione onco-soppressoria del miR199b-5p⁸ e del miR34a⁹ sia in Medulloblastoma e solo di recente in Glioma. Entrambi i miRNAs hanno un ruolo nel inibire la quota di cellule tumorali staminali nel tumore di Medullobla-

stoma, quota di cellule responsabile della rigenerazione del tumore, che si riattiva con radio-chemioterapia (terapia post-operatoria ora in uso in clinica). I nostri studi hanno effetti terapeutici importanti futuri e di rilevanza per prossimi studi in clinica nell'uomo.

Bene il mio seminario prenderà spunto da tali osservazioni per legare le conoscenze nel campo della immunologia e della terapia oncologica nel capire se è possibile colpire queste vie di comunicazione tra le cellule che circondano il tumore, incluso le cellule tumorali staminali ed il sistema immunitario, con alcuni esempi di ricerca recente prodotta dai membri del mio laboratorio.

Bibliografia essenziale

1. Isaiah J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Fidler. Nature Reviews Cancer*. 2003; 3: 453-458.
2. Spano D, Zollo M. Tumor microenvironment: a main actor in the metastasis process. *Clin Exp Metastasis*. 2012; 29: 381-395.
3. Spano D, Zollo M. Molecular networks that regulate cancer metastasis. *Semin Cancer Biol*. 2012; 22: 234-249.
4. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003; 63: 5821-5828.
5. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004; 432: 396-401.
6. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100(7):3983-8. Epub 2003 Mar 10. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 6890.
7. Huang SD, Yuan Y, Tang H, Liu XH, Fu CG, Cheng HZ, Bi JW, Yu YW, Gong DJ, Zhang W, Chen J, Xu ZY. Tumor cells positive and negative for the common cancer stem cell markers are capable of initiating tumor growth and generating both progenies. *PLoS One*. 2013; 8: e54579.
8. Garzia L, Andolfo I, Cusanelli E, Marino N, Petrosino G, De Martino D, Esposito V, Galeone A, Navas L, Esposito S, Gargiulo S, Fattet S, Donofrio V, Cinalli G, Brunetti A, Vecchio LD, Northcott PA, Delattre O, Taylor MD, Iolascon A, Zollo M. MicroRNA-199b-5p impairs cancer stem cells through negative regulation of HES1 in medulloblastoma. *PLoS One*. 2009; 4: e4998.
9. de Antonellis P, Medaglia C, Cusanelli E, Andolfo I, Liguori L, De Vita G, Carotenuto M, Bello A, Formiggini F, Galeone A, De Rosa G, Virgilio A, Scognamiglio I, Sciro M, Basso G, Schulte JH, Cinalli G, Iolascon A, Zollo M. MiR-34a targeting of Notch ligand delta-like 1 impairs CD15+/CD133+ tumor-propagating cells and supports neural differentiation in medulloblastoma. *PLoS One*. 2011; 6: e24584.

Cancer stem cells and metastasis: liaisons dangereuses

Riccardo Fodde

Erasmus Medical Center, Josephine Nefkens Institute, Rotterdam

Cancer stem cells (CSCs) represent a subpopulation of tumour cells endowed with self-renewal and multilineage differentiation capacity but also with an innate resistance to cytotoxic agents, a feature likely to pose major clinical challenges towards the complete eradication of minimal residual disease in cancer patients. Operationally, CSCs are defined by their tumour-propagating ability when serially transplanted into immune-compromised mice and by their capacity to fully recapitulate the original heterogeneity of cell types observed in the primary lesions they are derived from.

CSCs were first identified in haematopoietic malignancies and later in a broad spectrum of solid tumours including those of the breast, colon and brain. Notably, several CSC characteristics are relevant to metastasis, such as motility, invasiveness and, as mentioned above, resistance to DNA damage-induced apoptosis.

Here, we have reviewed the current literature on the relation between CSCs and metastasis formation. Preliminary studies on cancer cell lines and patient-derived material suggest a rate-limiting role for stem-like cells in the processes of tumour cell dissemination and metastasis formation. However, additional studies are needed to deliver formal proof of their identity as the cell of origin of recurrences at distant organ sites. Nevertheless, several studies have already provided pre-clinical evidence of the efficacy of novel therapies directed against disseminated CSCs.

Reference

Sampieri K, Fodde R. Cancer stem cells and metastasis. *Seminars in Cancer Biology*. 2012; 187: 22.

**IL RUOLO DEL MICROAMBIENTE
IN TUMORI SOLIDI**

Quale ruolo ha il microambiente nella progressione del carcinoma mammario?

Angela Amato, Vittoria Fotia, Alberto Zambelli

Oncologia Medica e Laboratorio di Oncologia Sperimentale e Farmacogenomica, IRCCS Fondazione “Salvatore Maugeri”, Pavia

Una serie di evidenze scientifiche hanno ormai concordemente identificato il “microambiente” come un attore decisivo nello sviluppo e nella crescita del tumore mammario. Attualmente, una tra le più incoraggianti vie esperite dalla ricerca oncologica focalizza l’attenzione non solo sulla cellula tumorale per sé, ma su comparti cellulari altri, considerati decisivi per la formazione della nicchia tumorale e metastatica. Tra questi comparti sono da annoverarsi quelli relativi alla matrice extracellulare, alle cellule endoteliali e alle strutture vascolari, le diverse componenti del sistema infiammatorio e immunitario nonché le cellule stromali e mesenchimali.

In particolare, il comparto stromale è oggetto di approfondita ricerca, poiché l’interazione osservate tra cellula tumorale e stroma costituisce uno dei più promettenti campi di indagine della modulazione della carcinogenesi del tumore mammario. Alcuni studi decisivi di biologia cellulare e molecolare hanno permesso di definire il “microambiente” e lo stroma come un fattore determinante nella prognosi nella predizione di risposta ai trattamenti antiproliferativi. Tra le diverse forme con cui la manipolazione del comparto stromale prende parte attiva nei processi di crescita del tessuto mammario, uno del tutto particolare è costituito dalle procedure di lipofiling (o “Fat Graft”) recentemente utilizzate nel contesto della medicina ricostruttiva e rigenerativa, dopo interventi di chirurgia mammaria maggiore.

Il lipofilling è una tecnica ricostruttiva in uso ormai da qualche anno in chirurgia estetica, recentemente viene utilizzata anche nella chirurgia oncoplastica. Il lipofilling viene utilizzato nella chirurgia ricostruttiva per la correzione di alterazioni morfologiche che seguono alla chirurgia conservativa o alla mastectomia.

I primi esperimenti sul lipofilling risalgono agli anni ottanta, la tecnica è stata perfezionata da Coleman nel 1995: il tessuto adiposo viene aspirato, centrifugato e iniettato nell’area dove è necessario il riempimento. Il grasso viene rimosso tramite liposuzione da aree precedentemente selezionate in base alle caratteristiche anatomiche del paziente (prevalentemente addome) quindi viene centrifugato rimuovendo le cellule ematiche ottenendo una matrice ricca in adipociti e di cellule precursori, in seguito viene iniettato nelle aree dove è necessario il riempimento. Nel tempo sono state affinate le tecniche per migliorare la percentuale di

pre-adipociti contenuti nei lipoaspirati al fine di migliorare il graft e il risultato complessivo della procedura. In genere quello che si osserva è un processo rigenerativo del tessuto stromale mammario che ottiene di supportare e “riempire” la componente ghiandolare che ha subito il danno chirurgico. Tuttavia, il lipofilling non può essere considerato come una semplice procedura di riempimento tissutale, poiché alcune altre caratteristiche ne accompagnano i risultati, tra cui il trofismo tissutale, i processi di vascolarizzazione e di nutrizione tissutale. In rari casi e spesso in modo imprevedibile i risultati del lipofilling divergono dalle attese e l’iniezione di tessuto adiposo può risultare in raccolte necrotiche, formazione di cisti o aumento di consistenza dei tessuti che possono mimare delle micro calcificazioni o dei processi eteroplastici.

La maggior parte degli paper sul lipofilling indagano la tecnica, i risultati estetici e i possibili fallimenti. Più recentemente alcuni autori hanno indagato il ruolo di questa procedura in relazione ai rischi connessi alla possibile recidiva di malattia neoplastica e più in generale riguardo le interazioni tra cellule tumorali e cellule mesenchimali (in varie fasi di sviluppo).

In questo scenario, numerosi studi che hanno valutato le interazioni tra le cellule adipose e le cellule neoplastiche. In una recente review, Lohsiriwat et al. ha posto l’attenzione sulla capacità di indurre proliferazione cellulare e stimolare l’angiogenesi di adipociti, cellule progenitrici e preadipociti, sottolineando che l’interazione stroma tumore può alimentare cellule dormienti. Dalle osservazioni raccolte sull’interazione tra le adipochine (che possono avere azione endocrina, paracrina e autocrina) e lo stroma sembra confermato un potenziale aumento della crescita delle cellule neoplastiche e un’interferenza con il microambiente peritumorale.

Muovendo da un pragmatico approccio clinico, l’impatto della procedura sulla crescita del carcinoma mammario è stato valutato in uno studio retrospettivo condotto da Petit et al. sulla casistica di lipofilling realizzata presso l’Istituto Europeo di Oncologia di Milano. Un totale di 321 pazienti, sottoposte a lipofilling tra il 1997 e il 2008, sono state incluse nello studio e sono state comparate con un gruppo di controllo, dopo stratificazione per note caratteristiche demografiche e di patologia (età, istologia, estensione di malattia, periodo della procedura, intervallo intercorso tra l’intervento per la neoplasia e l’intervento di lipofilling). Gli autori hanno evidenziato un paragonabile livello di rischio di recidiva locale tra i 2 gruppi di pazienti per i casi operati per carcinoma infiltrante, ma curiosamente hanno osservato un aumentato rischio di recidiva locale nelle pazienti sottoposte lipofilling nei casi operati per patologia in-situ DIN o LIN (neoplasie intraepiteliali). Questa osservazione ha suscitato un generale interesse sulla sicurezza ed efficacia della procedura e hanno spinto altri gruppi a confermare i dati preliminari.

Nella nostra esperienza, presso l’unità di Chirurgia Senologica della Fondazione S. Maugeri di Pavia, sono state analizzati tra il 2008 e il 2012, gli outcomes di 212 pazienti sottoposte a lipofilling dopo mastectomia o quadrantectomia per carcinoma mammario. I dati che abbiamo potuto osservare appaiono in prima istanza in linea con quanto riportato da Petit et al., ma consentono anche qualche ulteriore osservazione in casi selezionati, sottoposti a lipofilling nel contesto di una malattia mammaria metastatica ma clinicamente quiescente. Questi casi ottengono di

approfondire alcuni aspetti dell'eventuale cross-talk tra le cellule adipose (e loro precursori) e le cellule di carcinoma mammario e nonostante assumano per ora solo un significato aneddotico, suggeriscono alcuni spunti meritevoli di approfondimento.

Tra questi casi, riportiamo brevemente la storia clinica di 3 pazienti che suggeriscono possibili implicazioni cliniche nelle procedure di lipofilling.

La prima paziente in esame è una donna di 46 anni sottoposta nel dicembre 2006 a intervento di mastectomia e lipofilling per carcinoma duttale con presenza di carcinoma intraduttale EI: ER + PgR + c-erb B2 15% ki 67 40% Dopo 5 mesi dall'intervento comparsa di lesione pancreaticata istologicamente compatibile con primitività mammaria, inizia chemioterapia e successivamente la malattia a livello pancreatico viene resecata con successivo trattamento ormonale. Due anni dopo la resezione della singola lesione pancreaticata la signora viene sottoposta a nuova procedura di lipofilling. A quattro mesi dalla procedura la paziente viene sottoposta ad asportazione di recidiva del muscolo pettorale con il seguente EI: Localizzazione muscolare di carcinoma duttale con aspetti mucinosi, scarsamente differenziato, G3.ER 80% PgR: 10% Ki67: 60% c-erb B2 0 (negativo); segue radioterapia sulla parete toracica + Fulvestrant Dopo 9 mesi dal lipofilling comparsa di diffuse metastasi epatiche ossee polmonari e ossee per cui viene ripreso trattamento chemioterapico con successiva progressione di malattia che ha condizionato l'exitus della paziente dopo 12 mesi dalla recidiva loco regionale

Un altro caso è quello di una giovane donna con diagnosi di mastite carcinomatosa in corso di gravidanza per cui dopo il parto è stata sottoposta a trattamento combinato con antracicline e taxani e anti HER2 e a successivo intervento chirurgico con esito istologico di carcinoma scarsamente differenziato G3 ER 0% PgR: 0% Ki67: 10% c-erb B2 3+, più probabilmente di tipo duttale infiltrante ed estesi quadri di carcinoma intraduttale ad alto grado (DIN 3), presenza di invasioni vascolari peritumorale, spiccata, anche nel derma sub-areolare e presenza di metastasi linfonodali ascellari e sovraclaveari omolaterali. Seguiva radioterapia e terapia adiuvante con herceptin. La paziente è stata sottoposta procedura di lipofilling, dopo 4 mesi dall'ultima procedura la tac di rivalutazione ha evidenziato secondarismi in sede linfonodale, polmonare, encefalica, cutanea e mammaria sinistra. Sono trascorsi 9 mesi dalla diagnosi e la paziente sta ricevendo chemioterapia di seconda linea per la malattia metastatica

L'ultimo caso è quello di una paziente di 49 anni affetta da carcinoma mammella sinistra con metastasi linfonodali ed epatiche sincrone da carcinoma duttale infiltrante, G3, ER e PgR 0%, c erbB2 3+, come da biopsia mammaria (settembre 2009). Seguiva chemioterapia con remissione di malattia a livello epatico per cui la paziente è stata sottoposta a mastectomia radicale sinistra con inserimento di protesi con mastopessi a destra per carcinoma duttale infiltrante multifocale con estesi quadri di DIN 3 (G3, pT1, ER e PgR 0%, c erbB2 3+ Ki 67 80%) seguita da procedura di lipofilling, dopo 9 mesi dal lipofilling recidiva locale di malattia con comparsa di secondarismi a livello epatico e linfonodale. Sono trascorsi 7 mesi dalla recidiva locale e la paziente è attualmente sottoposta a trattamento di lesioni cerebellari secondarie di recente riscontro.

I tre casi suggeriscono un apparente aumento della velocità di crescita di malattie che apparivano sino alle procedure di lipofilling clinicamente stabile e pongono la domanda sulla potenziale attività delle procedura di fat-grafting sulle cellule tumorali residuali dopo chirurgia e/o presenti e nell'organismo a livello sistemico. Nel laboratorio di Oncologia Sperimentale e Farmacogenomica della Fondazione Salvatore Maugeri di Pavia è stato portato avanti uno studio che aveva come obiettivo la messa a punto di un protocollo per l'isolamento delle MSC dal lipoaspirato e loro caratterizzazione molecolare.

Questo studio ha mostrato che 5 ml di lipoaspirato sono sufficienti per l'isolamento di MSC, identificate per l'espressione di marcatori mesenchimali, come la vimentina, e di recettori superficiali come CD133, CD44, CD90, CD73. Queste cellule non sono di origine ematopoietica come dimostrato dalla negatività al recettore CD45.

Come atteso queste cellule mostrano una capacità proliferativa indipendente dall'ancoraggio ad un substrato e un alto potenziale differenziativo dal momento che, opportunamente stimulate, sono capaci di differenziare in adipociti, osteociti, condrociti o miociti.

Attualmente sono in corso gli esperimenti necessari alla valutazione delle interazioni fra le MSC e le cellule epiteliali tumorali di mammella e l'analisi molecolare dei pathways che possono intervenire nella regolazione di queste interazioni mediate da meccanismi di comunicazione per contiguità o continuità cellulare.

In occasione del corso saranno presentati i principali risultati delle ricerche e discusse le possibili implicazioni circa la sicurezza e l'efficacia del lipofilling e del trapianto autologo di cellule mesenchimali nelle pazienti affette da tumore alla mammella sottoposte a chirurgia mammaria resettiva.

Bibliografia

1. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* 2001; 11: S37-S43.
2. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell.* 2010; 18: 884-901.
3. Ilic D, Almeida EA, Schlaepfer DD, Dazin P, Aizawa S, et al. Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *J Cell Biol.* 1998; 143: 547-560.
4. Lohsiriwat V, Curigliano G, Rietjens M, Goldhirsch A, Petit JY. Autologous fat transplantation in patients with breast cancer: "silencing" or "fueling" cancer recurrence? *Breast.* 2011; 20: 351-357.
5. Petit JY, Botteri E, Lohsiriwat V, et al. Locoregional recurrence risk after lipofilling in breast cancer patients. *Ann Oncol.* 2012; 23: 582-588.
6. Petit JY, Rietjens M, Botteri E, et al. Evaluation of fat grafting safety in patients with intra epithelial neoplasia: a matched-cohort study. *Ann Oncol.* 2013; 7.
7. Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res.* 2010; 316: 1324-1331.
8. Pupa SM, Ménard S, Forti S, Tagliabue E. New insights into the role of extra-

- cellular matrix during tumor onset and progression. *J Cell Physiol.* 2002; 192: 259-267.
9. Regolo L, Galli L, Petrolo G, et al. Short commentaries on data published by Petit et al. on locoregional risk after lipofilling in breast cancer patients. *Breast.* 2013; 96-97.
 10. Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LB, Pizer ES, Cho KR, et al. (2003) Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell.* 3: 377-386.
 11. Triulzi T, Casalini P, Sandri M, Ratti M, Carcangiu ML, Colombo MP, Balsari A, Ménard S, Orlandi R, Tagliabue E. Neoplastic and stromal cells contribute to an extracellular matrix gene expression profile defining a breast cancer subtype likely to progress. *PLoS One.* 2013; 8.

Quale ruolo ha il microambiente nella progressione del tumore del colon-retto?

Enrico Giraudo

Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco, Università di Torino,
Istituto per la Ricerca e Cura del Cancro, Candiolo, Torino

Ruolo del microambiente nella crescita neoplastica: interazione tra le cellule tumorali e lo stroma

I tumori solidi come il tumore al colon-retto rappresentano una patologia complessa dove l'alta eterogeneità è determinata non solo dalle cellule tumorali e dalle loro mutazioni somatiche, ma anche dalle interazioni con i diversi tipi di cellule dello stroma come le cellule endoteliali, i periciti, i fibroblasti e le cellule infiammatorie (Fig. 1)¹. Durante la progressione tumorale le cellule del microambiente si modificano e si attivano attraverso segnali paracrini ed autocrini creando dei continui circuiti segnalatori che contribuiscono all'iniziazione neoplastica e alla formazione delle metastasi². Le terapie anti-tumorali e anti-angiogeniche e le nuove strategie che dovranno essere attuate per superare la resistenza ai trattamenti per il cancro al colon-retto e per altri tumori solidi, dovranno tenere conto, oltre che delle specifiche mutazioni oncogeniche di ogni singolo paziente, anche di questi circuiti segnalatori e regolatori delle diverse popolazioni cellulari del microambiente tumorale (Fig. 1)³.

Angiogenesi tumorale

La scoperta dell'importanza dell'angiogenesi tumorale come processo cruciale nel promuovere e regolare l'invasività e metastatizzazione tumorale, rappresenta la prima e più importante evidenza dell'importanza dello stroma della malattia neoplastica. La terapia anti-angiogenica rappresenta ad oggi la più importante terapia contro il microambiente tumorale impiegata in clinica in alternativa o in combinazione con trattamenti anti-tumorali sia per i tumori al colon-retto che per altri tumori solidi⁴.

L'angiogenesi tumorale è un processo attraverso il quale si formano nuovi vasi da vasi pre-esistenti nel tumore. È stato osservato che in assenza di una adeguata rete vascolare i tumori solidi non possono crescere oltre i 2 mm di diametro e raggiungere pertanto una dimensione critica per metastatizzare in altri organi.

Questo processo è regolato dall'equilibrio tra molecole pro- e anti angiogeniche che, se alterato, determina la formazione di una rete di vasi tumorali "anormali" che contribuiscono alla progressione metastatica⁴. L'ipotesi che il tumore produca sostanze angiogeniche diffusibili fu postulata nel 1968, anche se già 100 anni fa si era constatato che, attorno ai tumori, si formava una fitta rete vascolare. Nel 1971 Folkman formulò l'ipotesi che la crescita tumorale e la formazione delle metastasi fossero dipendenti dall'angiogenesi e che, quindi, bloccando l'angiogenesi, si sarebbe trovato il modo di arrestare la progressione del tumore⁵.

Si è osservato nel tumore l'"angiogenic switch", cioè l'attivazione dell'angiogenesi che avviene quando nella neoplasia si ha uno sbilanciamento verso i fattori pro-angiogenici rispetto agli inibitori⁶. In questi ultimi anni sono stati individuati diversi meccanismi e molecole che inducono questo switch che coopera alla progressione tumorale. Tra questi i più importanti sono:

- lo *stress metabolico* (basse concentrazioni di O₂, basso pH o ipoglicemia);
- *stress meccanici* (l'elevata pressione generata da cellule in proliferazione delle cellule tumorali);

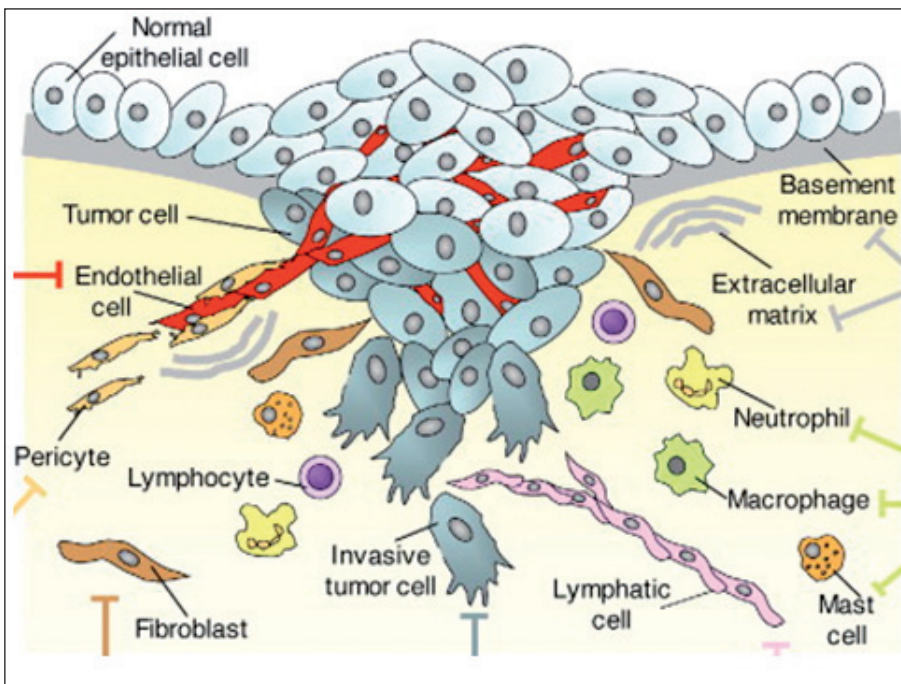


Fig. 1 - Microambiente tumorale e le popolazioni cellulari coinvolte nella progressione invasiva e metastatica dei tumori solidi. La crescita, invasione e metastatizzazione dei tumori solidi come il tumore del colon-retto viene regolata, oltre che dalle mutazioni delle cellule cancerose, anche da diverse cellule del microambiente tumorale e dalle loro interazioni. Tra queste cellule dello stroma tumorale troviamo le cellule endoteliali, i periciti, i leucociti (tra questi i linfociti T e i macrofagi associati al tumore, TAM) e i fibroblasti associati al tumore (CAF). Queste diverse sottopopolazioni di cellule "attivate" dello stroma, producendo fattori di crescita e chemochine, attivano a loro volta vie di trasduzione del segnale pro-invasive e pro-metastatiche nelle cellule tumorali¹⁻³.

- le *risposte infiammatorie ed immunitarie* (l'infiltrazione leucocitarie nei tumori);
- *mutazioni genetiche* (attivazioni di oncogeni o delezioni di geni soppressori del tumore che controllano la produzione di regolatori angiogenici);
- “*over-espressione*” di *fattori angiogenici* (tra i più importanti, il *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *platelet-derived growth factor B* (PDGF-B);
- *riduzione di fattori inibitori dell'angiogenesi* (tra i più importanti la *trombospondin-1* (TSP-1), Tumstatin (frammento proteolitico del collagene della matrice extracellulare)).

Questi diversi fattori possono essere secreti dalle cellule cancerose, dall'endotelio stesso, delle cellule infiammatorie (tumor-associated macrophages, TAM), dai fibroblasti-associati al cancro (CAF) e dalla matrice stessa. Il loro contributo dipende dal tipo di tumore, dalla sua localizzazione e dal grado di progressione del tumore stesso (Fig. 1)^{4,6,7}.

Terapia anti-angiogenica del tumore colon-retto

In questi anni, sulla base della maggior conoscenza dei meccanismi regolatori dell'angiogenesi tumorale sono stati caratterizzati meglio alcuni dei fattori pro-angiogenici allo scopo di sviluppare farmaci efficaci nell'inibire l'angiogenesi e la progressione neoplastica. Tra questi fattori il più studiato in questi ultimi 20 anni è il VEGF. VEGF chiamato anche vascular permeability factor (VPF) è il più potente attivatore dell'angiogenesi tumorale che promuove proliferazione, migrazione e differenziazione dei vasi tumorali⁸. Sono presenti diverse isoforme di VEGF ma la più potente e attiva nei tumori è l'isoforma VEGF-A. Questo fattore di crescita prodotto dalle cellule tumorali e da altre dello stroma, lega i recettori VEGFR1 e VEGFR2 espressi nei vasi tumorali inducendo un segnale attivatorio nell'endotelio⁹. Sono molti i meccanismi attraverso i quali VEGF-A viene espresso nel tumore. Tra i più importanti, è stato osservato che il tumore in crescita esponenziale e quindi con pochi vasi disponibili nel supplire i nutrienti e l'ossigeno, determina uno stato di ipossia cronica che induce l'espressione di *hypoxia inducible factor* (HIF-1 α). HIF-1 α aumenta l'espressione di diversi fattori pro-tumorali e tra questi VEGF-A che, a sua volta, promuove l'angiogenesi e favorisce la crescita e invasione del tumore⁴.

In questi ultimi 15 anni, la caratterizzazione di VEGF-A come potente fattore pro-angiogenico ha permesso lo sviluppo di diversi farmaci anti-angiogenici “anti-VEGF-A” per l'utilizzo in campo oncologico. Questi farmaci bloccano o sequestrano direttamente VEGF-A o, indirettamente, inibiscono la via di trasduzione del segnale agendo sui recettori VEGFR1 e R2^{9,10} (Fig. 2). Questi farmaci, testati inizialmente in modelli animali pre-clinici hanno dimostrato, in diversi tipi tumorali, tra i quali quello del colon-retto, una forte capacità di inibire la progressione tumorale¹¹. Questi studi incoraggianti sui modelli pre-clinici hanno spinto diverse industrie farmaceutiche a disegnare e produrre specifici inibitori di VEGF-A e del suo segnale da utilizzare in clinica.

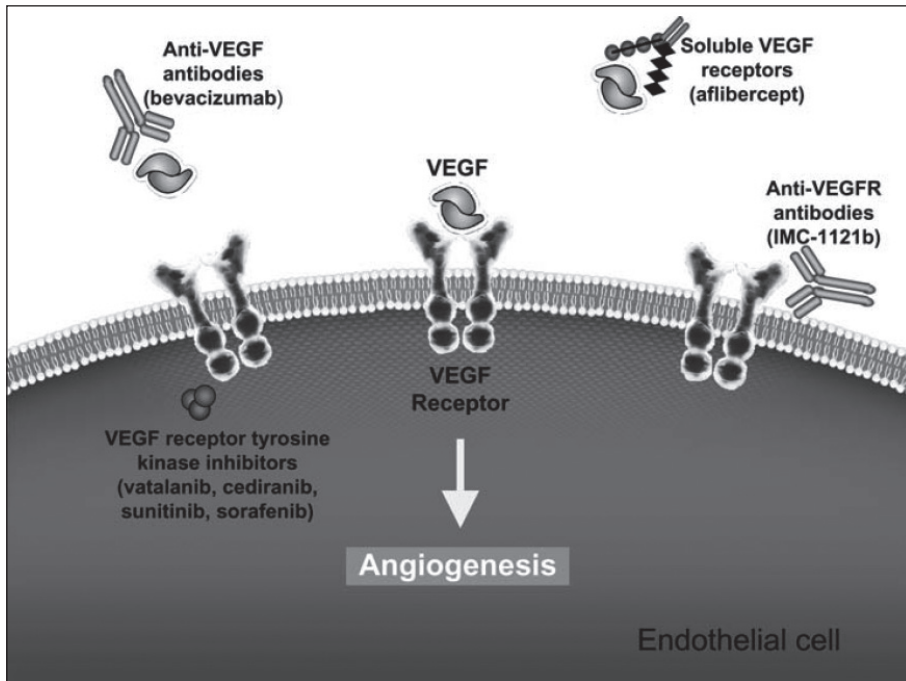


Fig. 2 - Il VEGF, i suoi recettori (in particolare VEGFR2) che trasducono in segnale attivatorio nelle cellule endoteliali. Esempi di alcuni dei farmaci anti-VEGF sviluppati recentemente per bloccare o direttamente VEGF-A o indirettamente il recettore VEGFR¹².

Il primo farmaco anti-angiogenico approvato nel 2003 dalla Food & Drug Administration (FDA) negli USA è stato l'anticorpo monoclonale (Mab) neutralizzante VEGF-A, *Bevacizumab* (Avastin, Genentech Inc.), approvato in combinazione con chemioterapici (standard of care, SOC), per trattare i pazienti con tumore metastatico al colon-retto (colorectal cancer, CRC)¹³. Il cancro colon-retto è stato il primo tumore ad essere trattato con una terapia combinata di chemioterapia e farmaci anti-angiogenici, strategia che è stata poi utilizzata in altri tipi tumorali. La terapia combinata di bevacizumab + farmaci chemioterapici aveva portato ad una sopravvivenza (overall survival) nei pazienti con tumore metastatico al colon-retto di 4,7 mesi superiore rispetto a quella osservata nei pazienti che hanno ricevuto solo la chemioterapia¹³. Questo effetto di aumento di sopravvivenza significativo ha pertanto dato il via ad una nuova "era" di terapie combinatorie anti-angiogeniche con bevacizumab e altri farmaci anti-VEGF-A per trattare sia il cancro al colon-retto che altri tumori solidi come il cancro del polmone (non-small-cell lung cancer, NSCLC), della mammella, del rene e il glioblastoma¹⁰. Per quanto riguarda la terapia anti-angiogenica specifica per il colon-retto, in questi ultimi 10 anni sono stati condotti numerosi trials e utilizzati farmaci diversi¹² (Tab. 1). Oltre a bevacizumab, ad esempio, è in fase di sviluppo per trattare pazienti con tumore colon-retto metastatico, il *VEGF-TrapR1R2* (Aflibercept; Regeneron Inc.), un recettore solubile chimerico contenente elementi strutturali dei due recettori VEG-

Tab. 1 - Elenco degli agenti anti-VEGF-A in fase sperimentale clinica per i tumori gastrici e del colon retto.

Drug name	Description	VEGF targets	Other targets	Status in global
Bevacizumab	Monoclonal antibody	VEGF-A		Marketed (CRC), Phase III ongoing (GC)
Aflibercept	Soluble receptor	VEGF-A		Phase III ongoing (CRC), Phase III planned (GC)
IMC-1121B	Monoclonal antibody	VEGFR-2		Phase II planned (CRC), Phase III planned (GC)
Valatanib	Tyrosine kinase inhibitor	VEGFR-1, -2, -3	PDGFR- β , c-kit	Phase III completed (CRC)
Cediranib	Tyrosine kinase inhibitor	vegfr-1, -2, -3		Phase III ongoing (CR)
Sunitinib	Tyrosine kinase inhibitor	VEGFR-1, 2, -3	PDGFR- α , - β , c-kit	Phase III ongoing (CRC), Phase II ongoing (GC)
Sorafenib	Tyrosine kinase inhibitor	VEGFR-2, -3	Raf-1, PDGFR- β , Flt-3, c-kit	Phase II ongoing, Phase III planned (GC)

Dati provenienti dall'US National Institutes of Health (Clinical Trials.gov). VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, VEGF receptor; CRC, colorectal cancer; GC, gastric cancer; PDGFR β , platelet-derived growth factor receptor- β ¹².

FR1 e R2 che blocca il segnale di VEGF; oppure un anticorpo monoclonale che blocca selettivamente VEGFR2 (*DC101* o IMC-1121B, ImClone System). Inoltre sono stati sviluppati diversi farmaci bloccanti il segnale intracellulare di VEGF, come gli inibitori delle tirosina chinasi dei recettori (receptor tyrosine kinases inhibitors, RTKIs). Tra quest'ultimi, *sunitinib* (SU11248; Sugen), un inibitore di VEGF-R2 e di PDGF-R β che agisce sia sulle cellule endoteliali che sui periciti e altri RTKI che inibiscono, ad affinità diverse, VEGFRs e altri recettori presenti non solo nell'endotelio ma anche in altri tipi cellulari del microambiente tumorale come *cediranib*, *vatalanib* e *sorafenib* (Tab. 1)^{10,12}. Molti di questi inibitori anti-angiogenici sono utilizzati anche per altri tumori metastatici oltre al colon-retto e hanno avuto simili effetti sulla sopravvivenza se somministrati in combinazione con chemioterapici. Uno degli ultimi inibitori angiogenetici sviluppati, *Aflibercept*, a differenza dagli altri, ha un'effetto specifico sul tumore del colon-retto ma non ad esempio sul tumore al polmone¹⁴. Questa evidenza sperimentale indica che tipi diversi tumorali presentano caratteristiche diverse di stroma e suggeriscono quindi che, in futuro, dovranno essere usati farmaci anti-angiogenici selettivi per tipi o sotto-tipi di tumore con il loro specifico microambiente tumorale per aumentare l'efficacia della terapia.

Resistenza alla terapia anti-angiogenica

Contrariamente a quanto previsto sulla base dei promettenti dati pre-clinici in modelli animali sugli effetti della terapia anti-angiogenica sulla progressione tumorale del colon retto e di altri tumori solidi, dopo diversi anni di trials clinici, è stata osservata una mancanza di efficacia a lungo termine nel bloccare la progressione metastatica nei pazienti trattati con farmaci anti-VEGF in combinazione con chemioterapici. È stato infatti descritto in questi ultimi anni una "resistenza" alla terapia anti-angiogenica (Fig. 3)^{15,16}. Questo fenomeno di resistenza, già osservata

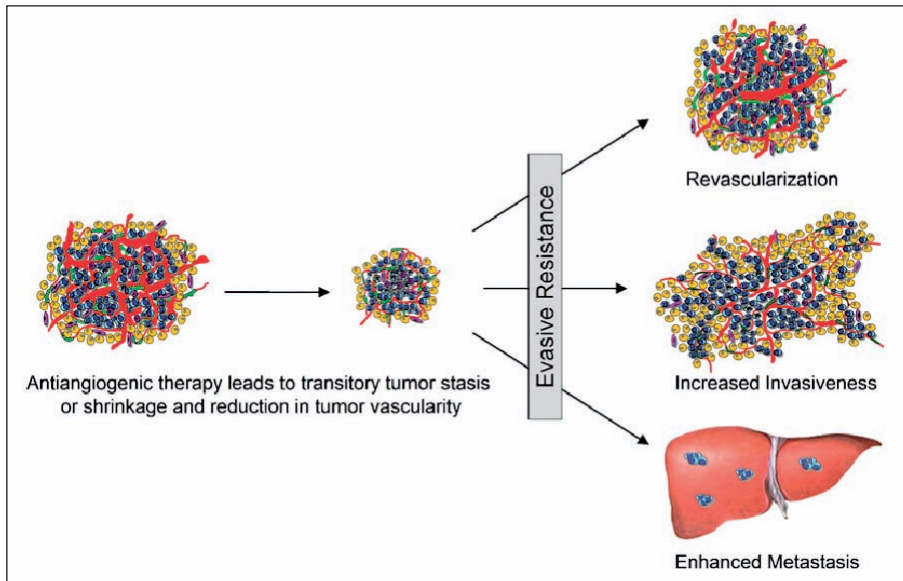


Fig. 3 - Resistenza invasiva alla terapia anti-angiogenica. Rappresentazione schematica della resistenza che il tumore instaura durante una terapia anti-angiogenica. Il tumore, ad opera del farmaco anti-angiogenico, riducendo drasticamente la rete vascolare, si riduce di volume e regredisce transitoriamente. Dopo questo iniziale effetto anti-tumorale, s'instaura una resistenza alla terapia e il tumore o le cellule infiammatorie reclutate nello stroma, producendo fattori pro-angiogenici diversi da VEGF-A, inducono una ri-vascolarizzazione e ri-crescita della neoplasia. In parallelo, la forte ipossia che s'instaura nei tumori trattati e il reclutamento dei TAM e CAF nello stroma, induce un fenotipo più aggressivo aumentando l'invasività e la formazione delle metastasi negli organi distali^{4,17,18}.

per altri farmaci anti-tumorali a bersaglio biologico (“targeted therapy”), è stato descritto meglio e in dettaglio nei modelli preclinici. È stato infatti descritto in diversi laboratori e utilizzando molteplici modelli tumorali murini (tra i quali quello del tumore al colon) come il tumore primario trattato con un farmaco anti-angiogenico inizialmente si riduca notevolmente di volume, ma in un secondo tempo, instauri una resistenza “invasiva” (“*evasive resistance*”) diventando più aggressivo e metastatico¹⁷⁻¹⁹. È stato osservato, ad esempio, in alcuni modelli murini tumorali, che il trattamento con farmaci anti-VEGF come DC101 o sunitinib, inibiva fortemente la crescita del tumore primario e l'angiogenesi, ma allo stesso tempo, induceva una maggiore invasività e la formazione delle metastasi (Fig. 3)^{17,19}.

Recentemente sono stati descritti diversi meccanismi che regolano la resistenza invasiva nei tumori solidi trattati con farmaci anti-angiogenici²⁰.

Tra questi meccanismi i più importanti e studiati:

- *l'aumento dell'ipossia cronica* che si forma nel tumore provocata dall'inibizione della crescita dei vasi²¹. La diminuzione dei livelli di ossigeno intratumorale contribuisce alla riduzione della crescita del tumore primario e della sua massa (inducendo, ad esempio, necrosi), ma allo stesso tempo attiva diverse vie di trasduzione del segnale che inducono un fenotipo tumorale invasivo e metastatico^{16,19,21}. È stato infatti dimostrato come l'ipossia cronica indotta da diversi

farmaci anti-VEGF, aumenti nel tumore l'espressione e attivazione del recettore c-Met e del ligando *hepatocyte growth factor* (HGF), molecole implicate nell'indurre invasività tumorale e la formazione delle metastasi^{19,22}. L'ipossia induce anche l'espressione e attivazione di una delle principali molecole regolatrici di diversi processi pro-metastatici come l'HIF-1 α . Questo marker, *insieme a carbonic anhydrase 9* (CA9), sono stati indicati recentemente come importanti predittori di una peggiore prognosi in pazienti metastatici al colon-retto e altri tumori solidi^{19,21}. Inoltre l'ipossia determina l'induzione dell'"*epithelial mesenchymal transition*" (EMT) caratterizzato da un'inibizione di markers epiteliali (come l'*E-caderina*) e l'aumento dell'espressione di markers mesenchimali (come la *vimentina*, *N-caderina*, *Snail-1*, *Twist* e *NF-kb*). L'attivazione di queste molteplici vie di traduzione inducono e sostengono un fenotipo tumorale invasivo e metastatico²⁰.

- *attivazione di vie di trasduzione del segnale pro-angiogenico, alternative a VEGF-A*. È stato infatti dimostrato come l'inibizione di VEGF-A nel tumore induca l'aumento di espressione e di attivazione di vie pro-angiogeniche alternative come *FGFb*, *PDGF-B*, *HGF*, *Placental growth factor* (*PlGF*), *granulocyte colony stimulating factor* (*G-CSF*). Queste diverse vie pro-angiogeniche VEGF-indipendenti contribuiscono alla ricrescita veloce del tumore, alla ri-vascularizzazione e alla progressione della malattia metastatica. Inoltre fattori come il G-CSF contribuiscono al reclutamento di macrofagi che contribuiscono ad indurre un fenomeno aggressivo del tumore^{10,23}.
- *reclutamento di cellule infiammatorie nel tumore*. Un'altra via di resistenza ai trattamenti anti-angiogenici è il reclutamento di cellule mieloidi del midollo osseo (bone-marrow-derived cells, BMDCs), in particolare di macrofagi associati al tumore (TAM) che promuovono e sostengono il tumore aumentando la sua invasività e capacità di formare metastasi^{23,24}.

Normalizzazione dei vasi tumorali

Più di 10 anni fa il prof. Rakesh Jain (Harvard University, Boston) per primo descrisse il fenomeno di "*normalizzazione dei vasi tumorali*" in tumori trattati con farmaci anti-angiogenici²⁵. Infatti Jain osservò, seguendo per diversi anni trials in fase avanzata (Phase II e III) di pazienti con glioblastoma e tumore al retto, che il trattamento con alcuni farmaci anti-VEGF (come il bevacizumab o RTKIs) insieme alla chemioterapia, induceva, per una *limitata finestra temporale* (*normalization window*), una normalizzazione della caotica rete vascolare tumorale, cioè la formazione di vasi meno ramificati, più simili ai vasi organizzati dei tessuti normali, con un maggior rivestimento di periciti e una conseguente maggior funzionalità (Fig. 4)^{26,27}. Diversi studi hanno dimostrato che il tumore, mentre cresce, producendo diversi fattori pro-angiogenici, induce vasi "anormali", caotici, molto ramificati, scarsamente ricoperti di periciti, poco perfusi e altamente permeabili. Questi vasi anormali inducono a loro volta un microambiente tumorale ostile aumentando l'ipossia, l'acidità e l'extravasazione di leucociti che insieme inducono un fenotipo tumorale più metastatico. L'aumentata permeabilità dei vasi, aumenta la

pressione interstiziale del tumore (tumor interstitial fluid pressure, IFP) che rende più difficile la fuori uscita dai vasi dei farmaci anti-tumorali. Inoltre i vasi anormali, poco funzionali e perfusi, rendono difficile la somministrazione di farmaci chemioterapici al tumore e limitano la loro efficacia^{20,28}. La normalizzazione dei vasi reverte questo fenotipo migliorando le funzionalità dei vasi tumorali. Questo processo riduce l'ipossia tumorale, diminuisce l'IFP, migliora la perfusione e aumenta quindi l'efficienza del trasporto dei farmaci chemioterapici al tumore, aumentando la loro efficacia. La normalizzazione dei vasi tumorali e i meccanismi che regolano questo processo, sono stati ampiamente studiati in diversi modelli

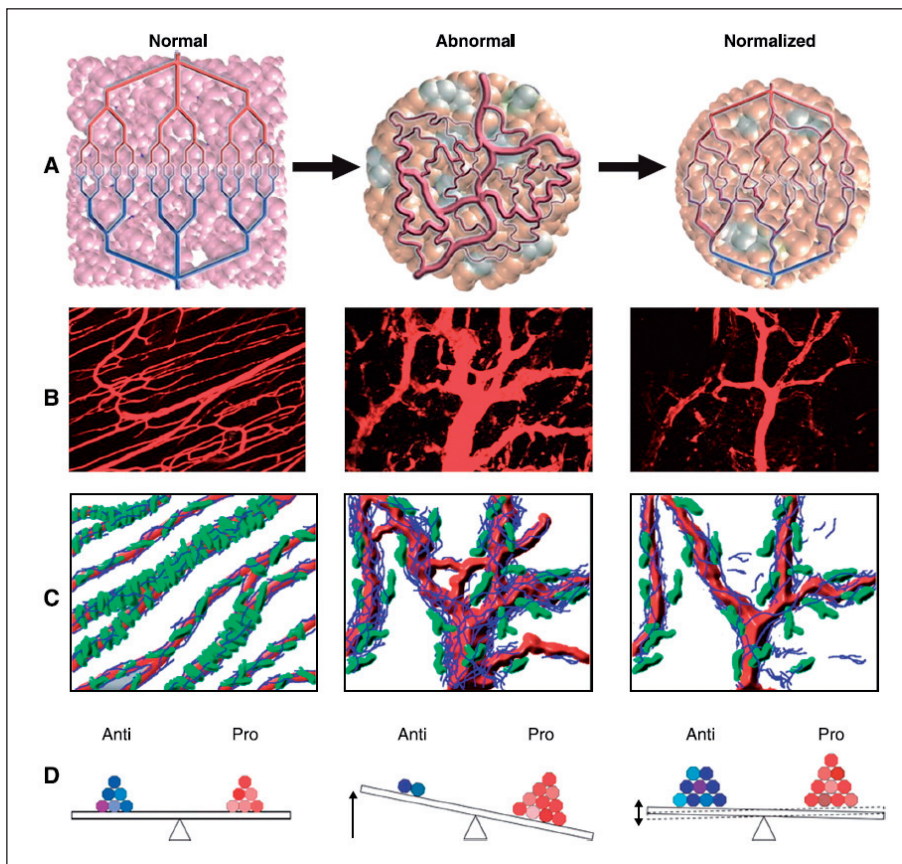


Fig. 4 - Normalizzazione dei vasi tumorali indotta dalle terapie anti-angiogeniche. La rete vascolare nel tumore è anormale, strutturalmente caotica, molto ramificata e non organizzata, rispetto a quella dei tessuti sani. Il trattamento di tumori solidi come quelli del colon-retto, determinano, per un periodo di tempo limitato, la formazione di vasi "normalizzati", cioè più simili a quelli osservati negli organi normali. I vasi normalizzati sono più funzionali e quindi efficaci nel trasportare i farmaci chemioterapici ai tumori, rispetto ai tumori non trattati. Inoltre i vasi normalizzati sono maggiormente ricoperti di periciti che rappresentano una barriera naturale all'extravasazione delle cellule tumorali e quindi alla formazione delle metastasi. Diversi sono i meccanismi che regolano questo processo e tra questi è stato osservato che l'aumento di fattori anti-angiogenici (e la concomitante riduzione dei fattori pro-angiogenici) nel tumore ristabilisce l'equilibrio e permette la formazione di una rete vascolare regolata e funzionale²⁸.

tumorali murini utilizzando diversi farmaci anti-angiogenici (Fig. 4)^{20,28}. Questi dati hanno pertanto rappresentato il razionale scientifico per il quale, in clinica, la terapia anti-angiogenica è quasi sempre somministrata ai pazienti in combinazione con la chemioterapia²⁸.

Future strategie per migliorare la terapia anti-angiogenica nel colon-retto e altri tumori

Aumento e mantenimento nel tempo della “normalization window” nel tumore

Uno dei problemi della scarsa efficacia della terapia anti-angiogenica nell'aumentare la sopravvivenza dei pazienti con neoplasia metastatica al colon-retto e altri tumori solidi è dovuto al fatto che la maggiorparte dei farmaci anti-angiogenici utilizzati non riescono a mantenere nel tempo la “normalization window”, fenomeno osservato sia in clinica che in modelli pre-clinici, per solo poche settimane durante il trattamento.

Diversi sono i meccanismi e le molecole che regolano questo processo. Ad esempio è stato dimostrato che *prolyl hydroxylase domain 2* (PHD2), una proteina “*sensor*” dei livelli dell'ossigeno tumorale che regola l'attività di HIF-1 α , è importante nell'indurre la normalizzazione dei vasi tumorali in diversi tipi tumorali²⁹. È stato inoltre osservato che la presenza o attivazione nel tumore di altre molecole come *regulator of G-protein signaling 5* (RGS5), *angiopoietin-1* e *-2* (Ang-1/2) e *transforming growth factor- β* (TGF- β), contribuiscono a determinare una rete vascolare normalizzata^{20,28}. Recentemente è stata individuata una nuova proteina, la *Semaforina 3A* (Sema3A), molecola che regola la funzione sia del sistema nervoso centrale che di quello vascolare, come un nuovo fattore “normalizzante” i vasi tumorali. È stato infatti osservato che la over-espressione della Sema3A in diversi modelli murini tumorali induce la normalizzazione dei vasi, riduce l'ipossia e migliora la somministrazione di farmaci chemioterapici nel tumore, con il risultato finale di superare la resistenza alla terapia anti-angiogenica e di ridurre la formazione delle metastasi^{30,31}. Insieme, questi fattori, rappresentano nuovi e futuri targets che permettono di aumentare e mantere costante nel tempo i vasi normalizzati e quindi di diminuire la progressione tumorale. Pertanto una delle nuove strategie nella terapia anti-angiogenica nei tumori solidi sarà la combinazione di trattamenti “normalizzanti” i vasi tumorali insieme alle terapie standard anti-tumorali e/o anti-angiogeniche^{20,28}. Attualmente, nell'istituto IRCC di Candiolo, dove svolgo la mia attività di ricerca, abbiamo iniziato un progetto collaborativo che prevede l'utilizzo di diverse strategie “normalizzanti” i vasi tumorali in combinazione con le terapie anti-angiogeniche e anti-tumorali approvati in clinica, utilizzando modelli murini di tumore al colon-retto e modelli di “*xeno-patients*”, cioè modelli animali nei quali sono stati impiantati biopsie di tumore e di metastasi di pazienti con tumore metastatico al colon-retto che permettono di seguire la progressione della malattia “personale e specifica” di ogni paziente e di poter intervenire in modo mirato. Questo lavoro permetterà di meglio valutare il ruolo e l'effetto di diverse molecole “pro-normalizzanti” nella progressione e metastatizzazione del tumore del colon-retto.

Simultanea inibizione di diversi tipi cellulari del microambiente tumorale

Come precedentemente descritto, lo stroma tumorale presenta diverse cellule “attivate”, oltre ai vasi tumorali, che contribuiscono alla progressione neoplastica invasiva e metastatica come i TAM e i CAF^{2,24,32,33}. È stato inoltre dimostrato che la resistenza alla terapia anti-angiogenica è in parte mediata dal reclutamento di *BMDCs* nello stroma tumorale che, producendo specifici fattori di crescita e chemochine, aumentano l’aggressività del tumore stesso^{10,23,33}. I TAM e altre cellule del sistema immunitario possono attivare a loro volta i fibroblasti trasformandoli in *myofibroblasti* o CAF che a loro volta possono contribuire e amplificare il fenotipo pro-metastatico tumorale^{2,31}. Pertanto il simultaneo trattamento e inibizione di queste sotto-popolazioni cellulari “attivate” del microambiente con terapie anti-angiogeniche e anti-tumorali rappresentano le nuove e future frontiere delle terapie oncologiche.

Individuazione e validazione di nuovi markers predittivi della risposta alla terapia anti-angiogenica

Uno dei motivi della mancanza di efficacia delle terapie anti-angiogeniche è la mancanza, ad oggi, di markers predittivi dell’efficacia della terapia anti-angiogenica in modo da poter selezionare i pazienti o sottopopolazioni di pazienti che rispondano ad una specifica terapia combinatoria e poter monitorare l’effetto durante il trattamento^{4,10,20}.

È stato infatti osservato che livelli elevati di VEGF circolante nel siero di pazienti trattati con farmaci anti-angiogenici, in alcuni casi, rappresenta un marker di risposta positiva (ed efficacia) al trattamento. È stato però anche descritto che elevati livelli nel plasma di VEGF durante la terapia fornisce, principalmente, informazione sulla farmacodinamica della terapia anti-angiogenica e non, in modo preciso e accurato, sulla risposta del paziente al trattamento.

Ultimamente, in diversi trials che utilizzando farmaci anti-VEGF per il trattamento di tumore al colon, è stata valutata l’espressione differenziale di alcune molecole coinvolte nella progressione tumorale e nell’attivazione dei macrofagi nei tumori prima e dopo il trattamento.

Questi studi hanno dimostrato che il trattamento con bevacizumab aumenta l’espressione di fattori come lo stromal cell-derived factor-1a (SDF-1a) e chemochine (come CXCR4, and CXCL6) che sono responsabili di un fenotipo tumorale invasivo e di un’attivazione dei TAM.

Hanno inoltre osservato in questi tumori un’inibizione dell’espressione di Ang-1, fattore normalizzante i vasi^{10,34}. L’analisi di questi fattori hanno indicato, pertanto, un’instaurarsi di una resistenza invasiva alla terapia anti-angiogenica, studi che permetteranno in futuro di modificare la terapia per evitare la progressione metastatica dopo il trattamento.

Sarà di estrema importanza in futuro, ampliare la conoscenza di nuove *molecole “normalizzanti lo stroma tumorale”*, e migliorare la misurazione e la validazione di markers predittivi sia nel siero che nelle biopsie dei pazienti trattati con farmaci anti-angiogenici per aumentare la loro efficacia e bloccare la resistenza e quindi la progressione metastatica del tumore.

Bibliografia

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144: 646-674.
2. Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res*. 2010; 316: 1324-1331.
3. De Palma M, Hanahan D. The biology of personalized cancer medicine: facing individual complexities underlying hallmark capabilities. *Mol Oncol*. 2012; 6: 111-127.
4. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011; 473: 298-307.
5. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971; 285: 1182-1186.
6. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996; 86: 353-364.
7. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 401-410.
8. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29: 789-791.
9. Tugues S, Koch S, Gualandi L, Li X, Claesson-Welsh L. Vascular endothelial growth factors and receptors: anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer. *Mol Aspects Med* 2011; 32: 88-111.
10. Shojaei F. Anti-angiogenesis therapy in cancer: current challenges and future perspectives. *Cancer Lett*. 2012; 320: 130-137.
11. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. 1993; 362: 841-844.
12. Iwasaki J, Nihira S. Anti-angiogenic therapy against gastrointestinal tract cancers. *Jpn J Clin Oncol*. 2009; 39: 543-551.
13. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004; 350: 2335-2342.
14. Clarke JM, Hurwitz HI. Ziv-aflibercept: binding to more than VEGF-A--does more matter? *Nat Rev Clin Oncol*. 2013; 10: 10-1.
15. Duda DG, Batchelor TT, Willett CG, Jain RK. VEGF-targeted cancer therapy strategies: current progress, hurdles and future prospects. *Trends Mol Med*. 2007; 13: 223-230.
16. Abdollahi A, Folkman J. Evading tumor evasion: current concepts and perspectives of anti-angiogenic cancer therapy. *Drug Resist Updat*. 2010; 13: 16-28.
17. Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*. 2009; 15: 220-231.
18. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8: 592-603.

19. Sennino B, McDonald DM. Controlling escape from angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12: 699-709.
20. Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2011; 10: 417-427.
21. Rapisarda A, Melillo G. Overcoming disappointing results with antiangiogenic therapy by targeting hypoxia. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012; 9: 378-390.
22. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell*. 2003; 3: 347-361.
23. Shojaei F, Ferrara N. Role of the microenvironment in tumor growth and in refractoriness/resistance to anti-angiogenic therapies. *Drug Resist Updat*. 2008; 11: 219-230.
24. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012; 21: 309-322.
25. Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med*. 2001; 7: 987-989.
26. Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med* 2004; 10: 145-147.
27. Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, et al. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell* 2007; 11: 83-95.
28. Goel S, Duda DG, Xu L, Munn LL, Boucher Y, Fukumura D, Jain RK. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev*. 2011; 91: 1071-1121.
29. Leite de Oliveira R, Deschoemaeker S, Henze AT, et al. Gene-targeting of *phd2* improves tumor response to chemotherapy and prevents side-toxicity. *Cancer Cell*. 2012; 22: 263-277.
30. Maione F, Capano S, Regano D, et al. Semaphorin 3A overcomes cancer hypoxia and metastatic dissemination induced by antiangiogenic treatment in mice. *J Clin Invest*. 2012.
31. Serini G, Bussolino F, Maione F, Giraudo E. Class 3 semaphorins: physiological vascular normalizing agents for anti-cancer therapy. *J Intern Med*. 2013; 273: 138-155.
32. Mantovani A, Germano G, Marchesi F, Locatelli M, Biswas SK. Cancer-promoting tumor-associated macrophages: new vistas and open questions. *Eur J Immunol*. 2011; 41: 2522-2525.
33. Squadrito ML, De Palma M. Macrophage regulation of tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *Mol Aspects Med*. 2011; 32: 123-145.
34. Xu L, Duda DG, di Tomaso E, et al. Direct evidence that bevacizumab, an anti-VEGF antibody, up-regulates SDF1alpha, CXCR4, CXCL6, and neuropilin 1 in tumors from patients with rectal cancer. *Cancer Res*. 2009; 69: 7905-7910.

**NUOVE PROSPETTIVE DI TERAPIA
ANTITUMORALE**

Terapia anti-angiogenetica: bersagli farmacologici e combinazione con farmaci citotossici

Stefano Fogli, Romano Danesi

U.O.C. Farmacologia Universitaria, Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana,
Dipartimento di Medicina Interna, Università di Pisa

L'angiogenesi e la sua regolazione

L'angiogenesi è un processo fisiologico deputato alla formazione di nuovi vasi ematici che svolge un ruolo importante anche nello sviluppo di un tumore. Infatti, il tessuto tumorale costruisce una rete vascolare di collegamento alla circolazione sistemica in risposta alle crescenti esigenze metaboliche creando, contestualmente, vie di disseminazione a distanza. La regolazione dell'angiogenesi avviene mediante un meccanismo complesso e ridondante che coinvolge numerosi fattori tra i quali, il più importante è il fattore di crescita di derivazione endoteliale (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF).

Il VEGF esplica i suoi effetti legandosi e attivando 3 tipi di recettori specifici (VEGF-R) presenti sulla superficie delle cellule (Korpanty et al., 2011):

- *Recettori di tipo 1*. Meno importanti, regolano la vasculogenesi (organizzazione strutturale della rete vascolare).
- *Recettori di tipo 2*. Più importanti, stimolano la proliferazione, la migrazione e la sopravvivenza della cellula endoteliale e contribuiscono al fenotipo pro-angiogenico del tumore attraverso le classiche vie di trasduzione intracellulari mediate dalla tirosinchinasi.
- *Recettori di tipo 3*. Coinvolti principalmente nei processi di linfoangiogenesi.

Il VEGF è presente in diverse forme di "splicing alternativo", cioè in catene polipeptidiche di diversa lunghezza, tutte in grado di interagire con il recettore specifico di tipo 2. Esso ha anche un effetto immunosoppressivo che si realizza con l'alterazione della funzionalità delle cellule dendritiche (attivatori principali del sistema immunitario), con la riduzione dell'immunità dell'ospite che favorisce lo sviluppo del tumore. La mancanza di ossigeno (ipossia), una condizione che è presente frequentemente all'interno della neoplasia in rapida crescita, rappresenta lo stimolo più potente per la produzione di VEGF. L'ipossia è un potente induttore del fattore di trascrizione HIF (*Hypoxia Inducible Factor*), che si unisce ad altre

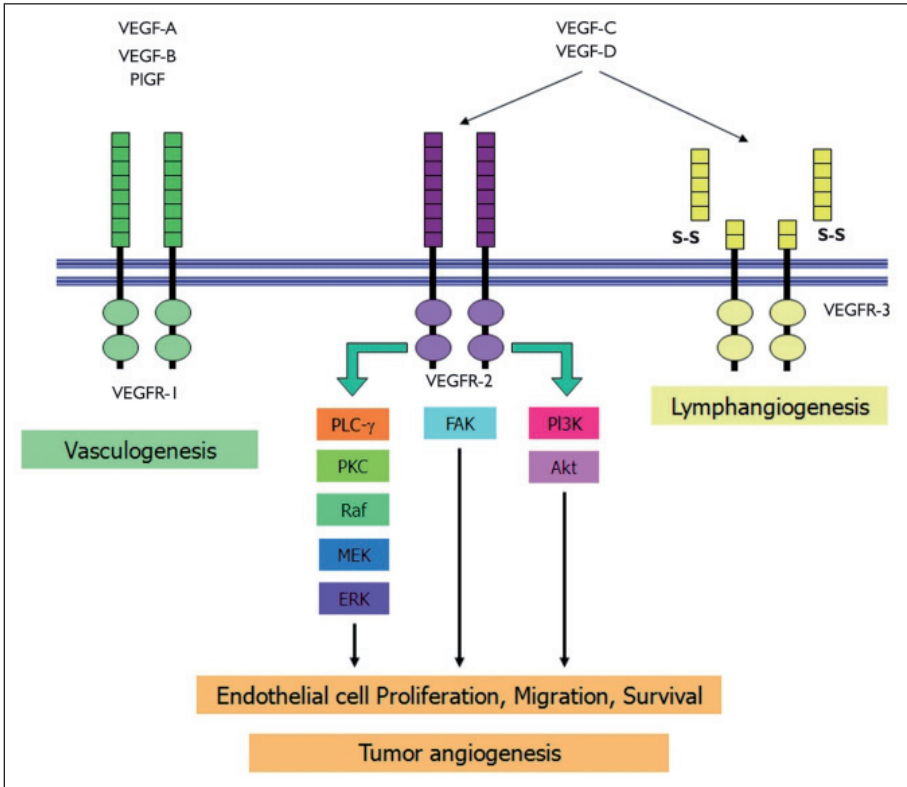


Fig. 1 - VEGF e regolazione dell'angiogenesi (Korpanty et al., 2011).

molecole (HIF1beta e p300) per formare un eterodimero e si lega a sequenze specifiche del DNA stimolando la produzione di notevoli quantità di diversi fattori pro-angiogenici: VEGF, FGF, PDGF e metalloproteinasi.

Il fattore HIF viene normalmente prodotto all'interno delle cellule, comprese quelle normossiche, ma la sua produzione è mediata da un processo di regolazione proteasomica, al quale prendono parte la proteina di *Von Hippel Lindau* (VHL) e l'e3 ubiquitina ligasi, tramite una reazione detta di ubiquitinazione. Nelle forme tumorali che presentano una mutazione di VHL viene ostacolata l'ubiquitinazione di HIF, che a sua volta è libero di stimolare la produzione di elevate quantità di fattori proangiogenici responsabili della vascolarizzazione abnorme e caotica del tumore. Un tipico esempio è rappresentato dal modello del carcinoma renale, nel quale si realizza una notevole angiogenesi con formazione di una fitta trama vascolare (Patel et al., 2006).

Differenze tra angiogenesi normale e tumorale

Le differenze tra angiogenesi normale e tumorale sono sia morfologiche che emodinamiche. Mentre il tessuto normale, infatti, è caratterizzato da un'architettura

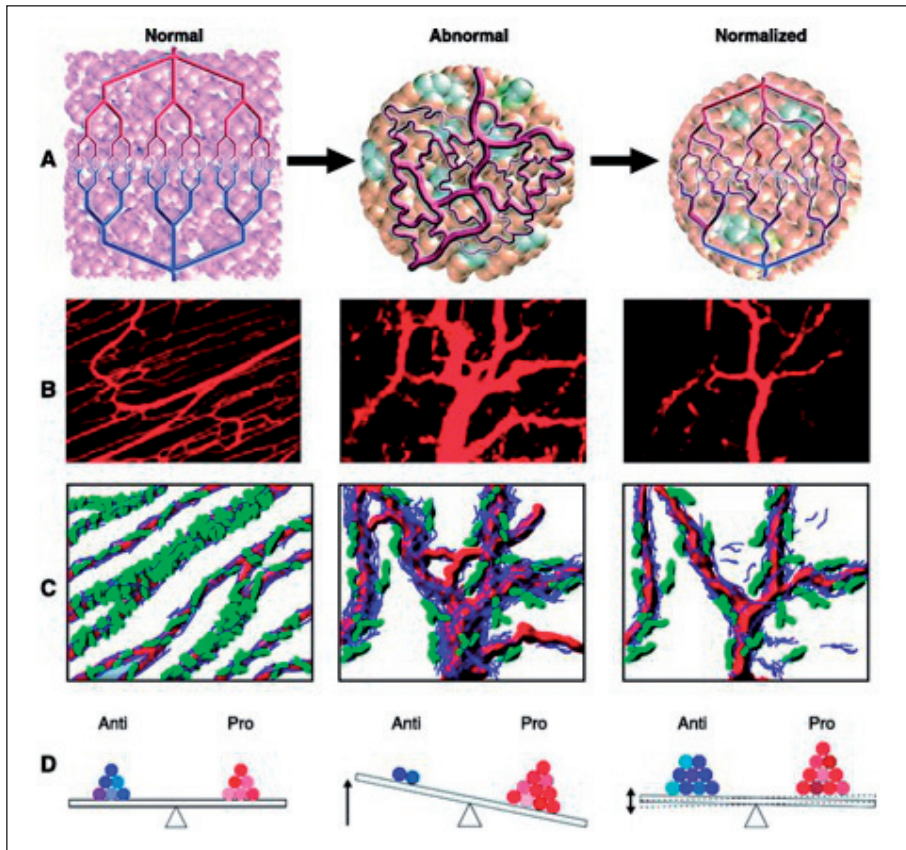


Fig. 2 - Confronto tra vascolarizzazione normale, anomala e normalizzata (Goel et al., 2011).

vascolare ordinata e da un calibro dei vasi adeguato a garantire il regolare flusso sanguigno, il tessuto tumorale si contraddistingue per la presenza di vasi di grandi e di piccole dimensioni, riduzioni di calibro improvvise, circoli collaterali e anastomosi, e vasi a fondo cieco. Il sistema assomiglia ad un plesso vasale immaturo e funzionalmente inefficiente, dal punto di vista dell'irrorazione sanguigna e della distribuzione di sostanze (tra cui i farmaci). Nonostante l'abbondanza di vasi, all'interno del tumore c'è ipossia con produzione di fattori pro-angiogenici (Mulder et al., 2010). Inoltre, nell'interstizio tumorale, per la notevole vasodilatazione, la fenestrazione dell'endotelio e lo stravasamento di proteine, il passaggio di liquidi e di sostanze dai capillari verso lo spazio intercellulare inizialmente abbondante tende poi a bloccarsi per mancanza di un drenaggio efficiente. Si crea una pressione di filtrazione negativa ed il capillare collapsa (Bauman et al., 2007). In questa rete anomala la distribuzione sanguigna è alterata (flusso rallentato "sluggish"), poiché il sangue tende a passare attraverso le zone periferiche del tumore e non all'interno di esso. Per questo motivo, la distribuzione dei farmaci in questo tipo di circolo non è ottimale. La pressione interstiziale è molto più elevata del norma-

le nei tumori, soprattutto in quello renale, ovarico e cervicale; comunque, anche negli altri tipi di tumore, come quello polmonare, la pressione è di circa 5 volte superiore al normale (Goel et al., 2011).

I meccanismi di formazione della rete vascolare tumorale sono i seguenti (Hillen et al., 2007):

- *Gemmazione di vasi sanguigni (sprouting angiogenesis)*. La formazione di gemme vascolari a partire da capillari già esistenti nella massa tumorale, che inviano propaggini e penetrano all'interno del tessuto formando un plesso vascolare abnorme. Questo meccanismo è responsabile del 70% dei fenomeni di vasculogenesi.
- *Reclutamento di cellule endoteliali circolanti progenitrici*. Il VEGF prodotto e secreto dalle cellule tumorali nel circolo sistemico agisce a distanza sul midollo osseo, mobilizzando cellule endoteliali che migrano e si insediano di nuovo nel tumore, dove è più elevata la concentrazione di VEGF.
- *Mimetismo vasculogenico (vasculogenic mimicry)*. Meccanismo caratteristico dei tumori ad elevata aggressività, in cui le cellule tumorali stesse si organizzano tra di loro a formare dei tubuli simil-vascolari con morfologia diversa dalla struttura normale e posti in contiguità con le cellule endoteliali (transizione mesenchimale). Il VEGF autocrino agisce sulla stessa cellula tumorale che l'ha prodotto inducendo la trasformazione in cellule endoteliali tumorali.
- *Angiogenesi per intussuscezione (intussusceptive angiogenesis)*. Il fattore di crescita derivato dalle piastrine (*Platelet Derived growth Factor*, PDGF) induce la segmentazione longitudinale di capillari già presenti nel tessuto, che si invaginano creando nuove gemme vascolari e setti. I vasi sanguigni si segmentano e si creano terminazioni cieche (in cui il flusso di sangue è inesistente), con ulteriore *sprouting* e diminuito farmacotropismo.
- *Cooptazione di vasi ematici contigui*. È un meccanismo mediato dalle angiopoietine.
- *Linfoangiogenesi*. Proliferazione all'interno del tumore di cellule che costituiscono i vasi linfatici. VEGF svolge un ruolo importante attraverso il recettore VEGFR3.

Meccanismo d'azione dei farmaci antiangiogenici

I farmaci antiangiogenici, normalizzando e ripristinando la rete vascolare, rallentano lo sviluppo del tumore (effetto antitumorale diretto) e migliorano anche la distribuzione dei farmaci citotossici nella massa tumorale (effetto antitumorale indiretto). La terapia antiangiogenica può svolgere anche un'azione di contrasto nei confronti degli effetti immunosoppressivi del VEGF.

I farmaci antiangiogenici possono essere classificati in base al meccanismo d'azione:

- *Inibitori tirosin-chinasici (Tyrosin Kinase Inhibitors, TKI)*. Penetrano all'interno della cellula tumorale e, bloccando l'attività enzimatica del recettore, interrompono la via di trasduzione del segnale mediato dai fattori di crescita proangiogenici, tra cui VEGF.

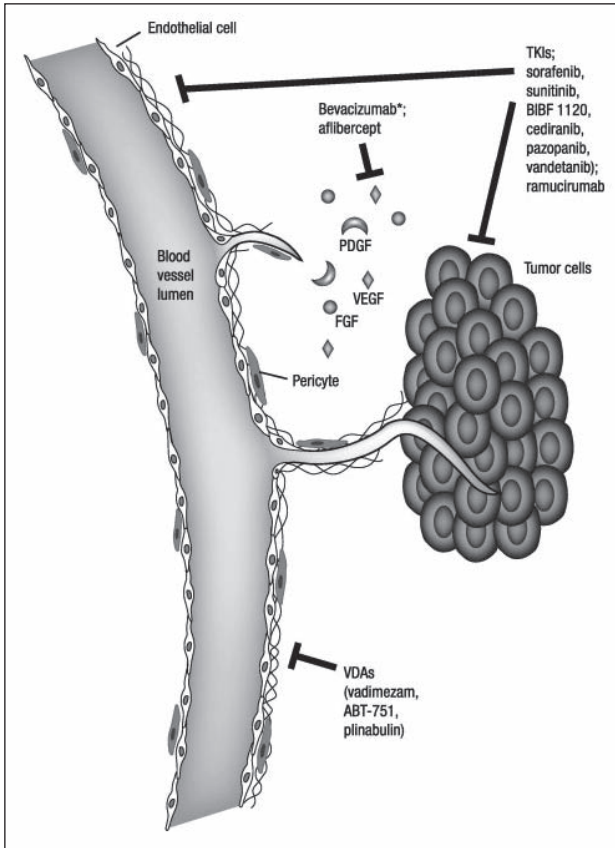


Fig. 3 - Meccanismo d'azione dei farmaci antiangiogenici (Reckamp, 2012).

- *Anticorpi monoclonali*. Si legano al VEGF libero impedendo al fattore di crescita di legarsi al proprio recettore.
- *Vascular-Disrupting Agents (VDA)*. Hanno come bersaglio la cellula endoteliale.

Interazioni tra farmaci antiangiogenici e citotossici

L'interazione tra farmaci antiangiogenici e citotossici può realizzarsi a due livelli: *farmacocinetico* e *farmacodinamico*. L'interazione *farmacocinetica* si realizza poiché la normalizzazione della rete sanguigna tumorale, dopo terapia con anticorpi monoclonali, migliora il tropismo dei farmaci citotossici nella massa tumorale (Weißhardt et al., 2012). Ad esempio, è stato dimostrato un aumento dell'attività antitumorale in vivo di irinotecan durante la normalizzazione vascolare transitoria causata dalla somministrazione di bevacizumab (Vangestel et al., 2011). Dickson et al. (2007) hanno inoltre dimostrato in un modello animale di neuroblastoma, che questo tipo di interazione prescinde dal tipo di chemioterapico usato in associazione con la terapia antiangiogenica, in quanto si manifesta

per farmaci citotossici con caratteristiche chimico-fisiche molto diverse fra loro (topotecano ed etoposide).

L'interazione *farmacodinamica* si basa sulla capacità che hanno alcuni farmaci citotossici di inibire l'angiogenesi tumorale. Ad esempio, i taxani (paclitaxel e docetaxel), inducono una significativa inibizione della migrazione delle cellule endoteliali a concentrazioni plasmatiche clinicamente significative. Questo spiega il razionale della scelta iniziale di inserire questi chemioterapici nella terapia integrata con bevacizumab e potrebbe giustificarne la loro maggiore attività nei tumori molto vascolarizzati, come quello dell'ovaio (Grant et al., 2003).

Modalità ottimale di somministrazione della terapia antiangiogenica

Guibal e Collaboratori (2010) hanno dimostrato in un modello animale che la sospensione della terapia con bevacizumab provoca la ripresa dell'attività tumorale, mentre la terapia continuativa con bevacizumab è in grado di mantenere l'effetto soppressivo sulla crescita tumorale. Un'altra osservazione sperimentale interessante è che la terapia anti-VEGF prolungata, potenzia l'attività dei farmaci citotossici e aumenta in maniera significativa la sopravvivenza degli animali, non solo rispetto al controllo e alla sola chemioterapia, ma anche all'associazione chemioterapia più anti-VEGF di breve durata (Bagri et al., 2010). I modelli preclinici dimostrano, quindi, che la soppressione continuativa di VEGF garantisce il massimo beneficio clinico sia in monoterapia che in associazione alla chemioterapia o in terapia di mantenimento dopo il termine della chemioterapia.

Meccanismi di resistenza ai farmaci antiangiogenici

Uno dei maggiori ostacoli alla terapia antiangiogenica è l'ipossia indotta dalla stessa terapia, che aumentando la produzione di HIF e di VEGF, innesca il fenomeno del *rebound* con rapida ricrescita dei vasi tumorali, se la terapia viene interrotta. Questo effetto è stato chiaramente dimostrato per i TKI, ad esempio sunitinib, che avendo una clearance rapida ed un'emivita dell'ordine di pochi giorni, se sospeso, causa precocemente un significativo *rebound* di vascolarizzazione (Nagengast et al., 2011). Al contrario, gli anticorpi monoclonali, come bevacizumab, avendo una clearance molto lenta e una lunga emivita (circa 20 giorni), permane in circolo per molto tempo anche dopo la sospensione del trattamento, mantenendo il blocco del VEGF in eccesso ed evitando il fenomeno del *rebound*. Una recente analisi retrospettiva di 5 studi di fase III su 4205 pazienti con tumori della mammella, del colon-retto, del rene e del pancreas (Miles et al., 2011) conferma che la soppressione continua di VEGF con terapia di mantenimento può rappresentare una valida strategia farmacologica.

Conclusioni

- L'angiogenesi è un meccanismo fondamentale per lo sviluppo dei tumori e il valore prognostico di VEGF è stato dimostrato in diverse neoplasie

- Il processo abnorme di angiogenesi tumorale produce una condizione di farmaco-resistenza limitando la penetrazione dei farmaci citotossici nella massa neoplastica
- Le terapie anti-VEGF sono in grado di ripristinare la distribuzione dei farmaci citotossici all'interno dei tumori
- È possibile ottenere un effetto sinergico associando razionalmente farmaci antiangiogenici con farmaci citotossici idonei

Bibliografia

1. Bagri A, et al. Effects of anti-VegF treatment duration on tumor growth, tumor regrowth, and treatment efficacy. *Clin Cancer Res.* 2010; 16: 3887-3900.
2. Bauman JE, et al. Antagonism of platelet-derived growth factor receptor in non small cell lung cancer: rationale and investigations. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: s4632-s4636.
3. Dickson PV, et al. Bevacizumab-induced transient remodeling of the vasculature in neuroblastoma xenografts results in improved delivery and efficacy of systemically administered chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 3942-3950.
4. Goel S, et al. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev.* 2011; 91: 1071-1121.
5. Grant DS, et al. Comparison of antiangiogenic activities using paclitaxel (taxol) and docetaxel (taxotere). *Int J Cancer.* 2003; 104: 121-129.
6. Guibal A, et al. Noninvasive contrast-enhanced Us quantitative assessment of tumor microcirculation in a murine model: effect of discontinuing anti-VegF therapy. *Radiology* 2010; 254: 420-429.
7. Hillen F, et al. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26: 489-502.
8. Korpanty G, et al. Update on anti-angiogenic therapy in non-small cell lung cancer: Are we making progress? *J Thorac Dis.* 2011; 3: 19-29.
9. Miles D, et al. Disease course patterns after discontinuation of bevacizumab: pooled analysis of randomized phase III trials. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 83-88.
10. Mulder WJ, et al. Imaging of angiogenesis. *Angiogenesis.* 2010; 13: 71-74.
11. Nagengast W, et al. VegF-PeT imaging is a noninvasive biomarker showing differential changes in the tumor during sunitinib treatment. *Cancer Res.* 2011; 71: 143-153.
12. Patel PH, et al. Targeting von Hippel-Lindau pathway in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 7215-7220.
13. Reckamp KL. Antiangiogenic agents as second-line therapy for advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2012; 321: 101-109.
14. Vangestel C, et al. ^{99m}Tc-(Co)₃ His-Annexin A5 Micro-sPeCT Demonstrates Increased Cell Death by Irinotecan During the Vascular normalization Window Caused by Bevacizumab. *J nucl Med.* 2011; 52: 1786-1794.
15. Weißhardt P, et al. Tumor vessel stabilization and remodeling by anti-angiogenic therapy with bevacizumab. *Histochem Cell Biol.* 2012; 137: 391-401.

From chemoprevention to target therapy: the example of aspirin

Andrea De Censi, Domenico Marra, Marilena Petrera

Oncologia Medica, Ospedali Galliera, Genova

Acetylsalicylic acid was first synthesized in 1897 by Felix Hoffmann and marketed by Bayer as Aspirin. Since its initial use as an analgesic, aspirin has been proven beneficial for preventing myocardial infarction and stroke in high-risk individuals¹. After 100 years of use, new indications still continue to be explored for instance its potential as cancer chemopreventive agent. The strongest proof of aspirin's antineoplastic effect has been in colorectal tumors.

Several epidemiological studies², randomized controlled trials of colon polyp recurrence³, and randomized trials in patients with hereditary colorectal cancer syndromes⁴⁻⁶ have shown that aspirin reduces incidence of colorectal neoplasia. Rothwell et al.⁷ recently obtained long-term follow-up data on cancer outcomes for several randomized trials of aspirin that were originally designed to examine its effect on cardiovascular disease prevention. An initial pooled analysis of nearly 14,000 patients from five trials showed that daily aspirin at any dose reduced risk of colorectal cancer by 24% and of associated mortality by 35% after a delay of 8-10 years. A subsequent pooled analysis on mortality due to all cancers established that a low dose of aspirin (75 mg per day, a quarter of the normal dose used for pain relief) taken for longer than five years reduces death rates from bowel cancer by more than a third. After 5 years of taking aspirin, the data from patients in the trials showed that death rates were 34% less for all cancers and as much as 54% less for gastrointestinal cancers, such as oesophagus, stomach, bowel, pancreas and liver cancers. The benefits from aspirin continued over time. The risk of cancer death over a period of 20 years remained 20% lower for all solid cancers among those who had taken aspirin (even though they would have been unlikely to have continued taking aspirin after the trials finished), and 35% lower for gastrointestinal cancers. It took about 5 years to see a benefit in taking aspirin for oesophagus, pancreatic, brain, and lung cancer; about 10 years for stomach and bowel cancer; and about 15 years for prostate cancer. The 20-year risk of death was reduced by about 10% for prostate cancer, 30% for lung cancer, 40% for bowel cancer and 60% for oesophagus cancer (Fig. 1)⁸.

Moreover, important implications for both prevention and treatment of cancer were reported from Rothwell et al in a recent study involving 5 UK trials⁹.

Participants that regularly took aspirin had lower rates of distant metastasis or

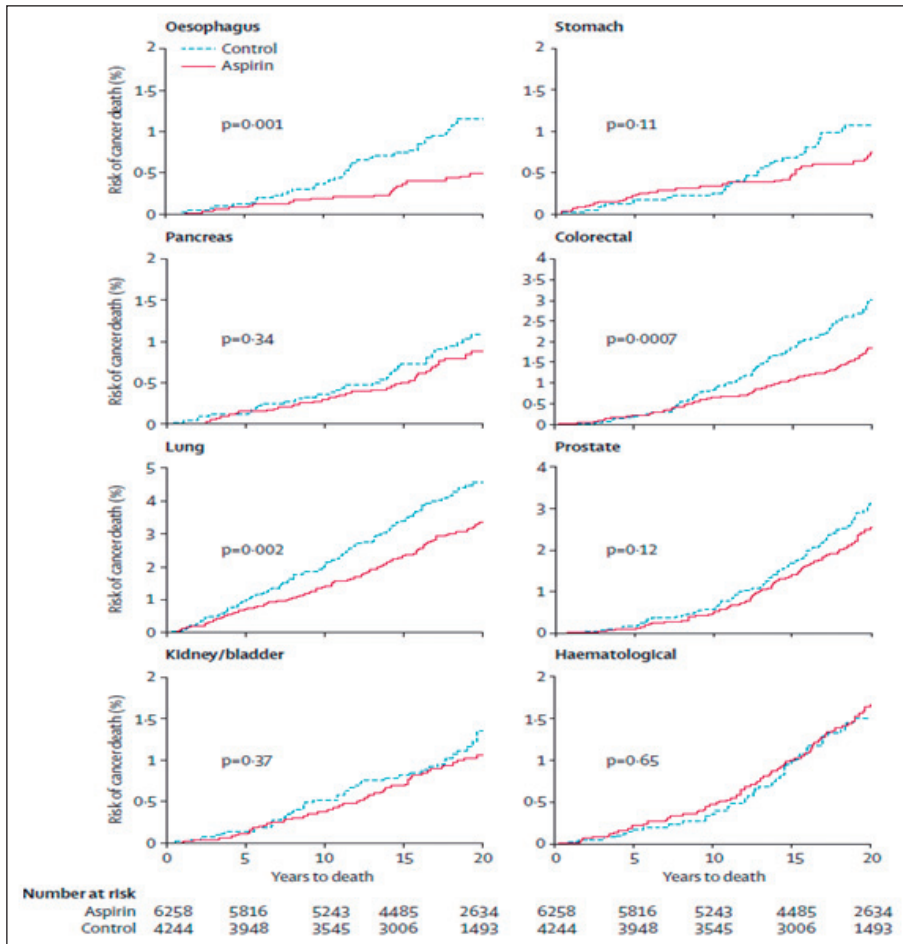


Fig. 1 - Effect of allocation to aspirin versus control on the 20-year risk of death due to the most common fatal cancers in the 10,502 patients with scheduled treatment duration of 5 years or longer in the three trials with long-term follow-up (From Rothwell et al. Lancet. 2011; 377: 31-41).

spread to regional lymph nodes; the metastasis observation could also “explain the apparent early reduction in cancer incidence on aspirin” seen in the primary prevention trials analyzed. The authors suggest that because platelets play a role in metastasis to distant tissues, aspirin’s effect may be related to a change in the platelets’ dynamics. Aspirin has been studied also in patients with specific genetic mutation such as PI3K and Lynch syndrome. It is well known that people with a monogenic predisposition to cancer offer an ideal focus for target therapy trial. Aspirin may suppress cancer cell growth by blocking the PI3K pathway. Liao et al.¹⁰ report the results of molecular investigations of data on 964 patients with colorectal cancer from two prospective cohort studies. The authors found that the use of aspirin after diagnosis among patients with mutated-PIK3CA colorectal cancer was associated with a 46% reduction in overall mortality and

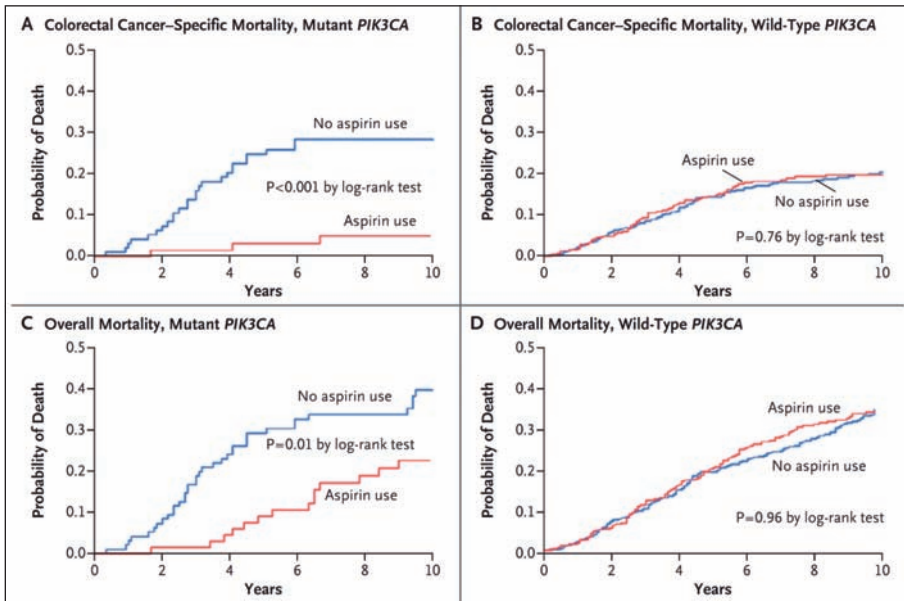


Fig. 2 - Mortality among patients with colorectal cancer, according to regular use or nonuse of aspirin after diagnosis and *PIK3CA* mutation status (From Liao et al. *N Engl J Med* 2012; 367: 1596-1606).

an 82% reduction in colorectal cancer-specific mortality (Fig. 2). In the CAPP2 trial⁵ carriers of Lynch Syndrome ($n=861$) were randomly assigned in a two-by-two factorial design to 600 mg aspirin or aspirin placebo or 30 g resistant starch or starch placebo for up to 4 years. Colorectal cancer (not combined with adenoma) developed in fewer patients on aspirin (4%) than in those not on aspirin (7%; hazard ratio [HR] 0.63, 95% CI 0.35–1.13, $p=0.12$) in an intention-to-treat (ITT) analysis, and significantly fewer (HR 0.41, 95% CI 0.19–0.86, $p=0.02$) in a prespecified per-protocol analysis (in about 60% of long-term patients; aspirin treatment for ≥ 2 years ascertained by extrapolated tablet counts). Aspirin was associated with a reduced risk of colorectal cancer (incidence rate ratio 0.56, 95% CI 0.32–0.99, $p=0.05$) in ITT analyses accounting for multiple primary colorectal cancers in some individuals.

Although evidence that aspirin prevents cancer is compelling, the underlying molecular mechanism remains enigmatic. Numerous molecular targets have been implicated but the antitumor activity of aspirin cannot be wholly attributed to a single target. It is likely that aspirin influences several molecular pathways and that the nonspecific nature of the effect may be a key to cancer prevention.

Long-term follow-up of randomized trials has shown that aspirin does reduce the risk of colorectal cancer after delay of several years, probably by reducing precancerous adenomas, possibly by inhibition of COX-2¹¹.

Aspirin induces bleeding, predominantly in the gastrointestinal and genitourinary tracts, which results from inhibition of COX-1 activity in platelets, preventing aggregation. The risk of serious gastrointestinal bleeds over 10 years increases from

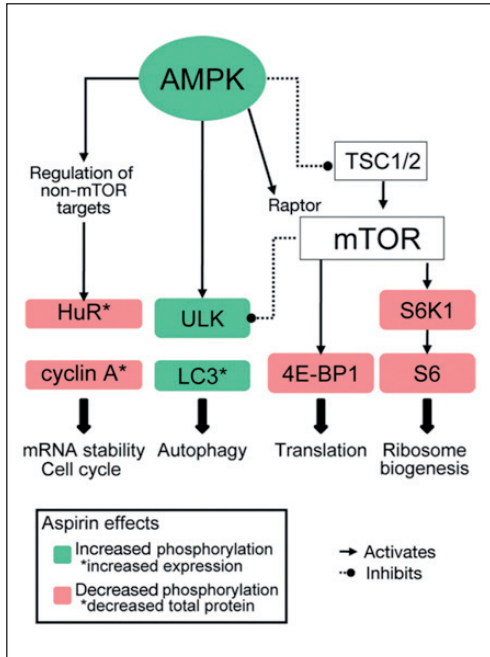


Fig. 3 - Aspirin targets multiple components of the AMPK/mTOR signaling pathway in colorectal cancer. Aspirin increases phosphorylation of AMPK and ULK1. Aspirin inhibits mTOR signaling as evidenced by decreased phosphorylation of S6K1, S6, and 4E-BP1. Hence, aspirin is targeting multiple cellular pathways involved in mRNA stability, cell cycle, autophagy, protein translation, and ribosome biogenesis (From Din et al. *Gastroenterology*. 2012; 142: 1504-1515).

about 1% in untreated individuals to about 2–3% in those who take regular aspirin¹². This risk increases with age¹³ and dose¹⁴. Also extracranial haemorrhages can occur but preliminary results suggest that these diminish with longer follow-up¹⁵. Recent data have shown that aspirin targets the AMPK/mTOR signaling pathway at several level in CRC cells, thus gaining new understanding of the molecular mechanisms underlying (Fig. 3)^{16,17}. Findings that AMPK cause inhibition of progress through the cell cycle and that mechanism of AMPK activation required the presence of the tumor suppressor LKB1 also induced the idea that AMPK activators might be useful in the prevention and /or treatment of cancer¹⁸.

References

1. US Preventive Services Task Force. Aspirin for the prevention of cardiovascular disease: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med* 2009; 150: 396-404.
2. US Preventive Services Task Force. Routine aspirin or nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the primary prevention of colorectal cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med* 2007; 146: 361-364.
3. Cole BF, Logan RF, Halabi S, et al. Aspirin for the chemoprevention of colorectal adenomas: meta-analysis of the randomized trials. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 256-266.
4. Burn J, Bishop DT, Chapman PD, et al. A randomized placebo-controlled pre-

- vention trial of aspirin and/or resistant starch in young people with familial adenomatous polyposis. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011; 4: 655-665.
5. Burn J, Gerdes A, Macrae F, et al, on behalf of the CAPP2 Investigators. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *Lancet* 2011; 378: 2081-2087.
 6. Flossmann E, Rothwell PM; British Doctors Aspirin Trial and the UK-TIA Aspirin Trial. Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies. *Lancet*. 2007; 369 (9573): 1603-1613.
 7. Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, Norrving B, Algra A, Warlow CP, Meade TW. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomized trials. *Lancet*. 2010; 376 (9754): 1741-1750.
 8. Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet*. 2011; 377: 31-41.
 9. Rothwell PM, Wilson M, Price JF, Belch JF, Meade TW, Mehta Z. Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials. *Lancet* 2012; 379: 1591-1601.
 10. Liao X, Lochhead P, Nishihara R, et al. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med* 2012; 367: 1596-1606.
 11. Chan AT, Ogino S, Fuchs CS. Aspirin and risk of colorectal cancer in relation to expression of COX-2. *N Engl J Med* 2007; 356: 2131-2142.
 12. Derry S, Loke YK. Risk of gastrointestinal haemorrhage with long term use of aspirin: meta-analysis. *BMJ*, 2000; 321: 1183-1187.
 13. Boers M, Tangelder MJ, H van Ingen, et al. The rate of NSAID-induced endoscopic ulcers increases linearly but not exponentially with age: a pooled analysis of 12 randomised trials. *Ann Rheum Dis*, 2007; 66: 417-418.
 14. Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, Malinin AI, Baggish JS, Bhatt DL, Topol EJ. Analysis of risk of bleeding complications after different doses of aspirin in 192,036 patients enrolled in 31 randomized controlled trials. *Am J Cardiol*. 2005; 95 (10): 1218-1222.
 15. Rothwell PM, Price JF, Fowkes FG, Zanchetti A, Roncaglioni MC, Tognoni G, Lee R, Belch JF, Wilson M, Mehta Z, Meade TW. Short-term effects of daily aspirin on cancer incidence, mortality, and non-vascular death: analysis of the time course of risks and benefits in 51 randomised controlled trials. *Lancet*. 2012; 379 (9826): 1602-1612.
 16. Din FV, Valanciute A, Houde VP, Zibrova D, Green KA, Sakamoto K, Alessi DR, Dunlop MG. *Gastroenterology*. 2012; 142: 1504-1515.
 17. Hawley SA, Fullerton MD, Ross FA, Schertzer JD, Chevtzoff C, Walker KJ, Pegg MW, Zibrova D, Green KA, Mustard KJ, Kemp BE, Sakamoto K, Steinberg GR, Hardie DG. The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase. *Science* 2012; 18; 336 (6083): 918-922.
 18. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern. *Chem Biol*. 2012; 19 (10): 1222-1236.

Farmaci immunomodulatori, microambiente e nuovi bersagli molecolari

Antonio Sica

Laboratorio di Immunologia Molecolare, IRCCS Istituto Clinico Humanitas, Rozzano (MI)

I macrofagi sono una componente essenziale dell'immunità innata e giocano un ruolo centrale nei processi infiammatori e nella difesa dell'ospite. Inoltre, queste cellule svolgono funzioni omeostatiche, tra cui il rimodellamento dei tessuti nell'ontogenesi e l'orchestrazione di funzioni metaboliche. Cellule della linea monocito/macrofagica sono caratterizzate da una notevole diversità e plasticità funzionale.

Nei tessuti, i fagociti mononucleati rispondendo agli stimoli ambientali (es. prodotti microbici, cellule danneggiate, linfociti attivati) con l'acquisizione di diversi fenotipi funzionali. In risposta a vari segnali, i macrofagi possono esprimere attivazione M1 (in risposta a ligandi TLR e IFN- γ) o alternativa M2 (stimolati da IL-4/IL-13); ciò in analogia alla polarizzazione TH1-TH2 delle cellule T. Il fenotipo M1 si caratterizza per l'espressione di alti livelli di citochine pro-infiammatorie, elevata produzione di azoto reattivo e intermedi di ossigeno, la promozione della risposta Th1 e forte attività microbicida e tumoricida. Al contrario, macrofagi M2 sono coinvolti nella resistenza ai parassiti, promuovono il rimodellamento tissutale e la progressione tumorale, e hanno funzioni immunoregolarie. Essi sono caratterizzati da attività fagocitica efficiente, alta espressione di molecole di scavenging, produzione di ornitina e poliammine attraverso la via dell'arginasi, e un profilo IL-12^{low}IL-10^{high}IL-1decoyR^{high}IL-1RA^{high}. Macrofagi M1 e M2 sono distinti anche nella produzione di chemochine. Vari segnali, incluso IL-10, ormoni glucocorticoidi, molecole rilasciate dalle cellule apoptotiche e complessi immuni, possono influenzare profondamente la funzione dei monociti-macrofagi, inducendo un fenotipo M2. Il fenotipo dei macrofagi polarizzati M1 e M2 può, in una certa misura, essere modulato in vitro e in vivo. Inoltre, varie patologie sono spesso associate a cambiamenti dinamici nella attivazione dei macrofagi, con macrofagi M1 implicati nel promuovere e sostenere l'infiammazione e le cellule M2 associate alla risoluzione della risposta infiammatoria. Non è chiaro se la polarizzazione dei macrofagi comporti il reclutamento di precursori circolanti o la loro rieducazione delle cellule in situ. Tuttavia, è ora evidente che le cellule T specializzate o polarizzate (TH1, TH2, Treg), svolgono un ruolo centrale nella polarizzazione macrofagica.

Cellule mieloidi e microambiente tumorale

La costruzione di un microambiente infiammatorio fornisce il combustibile per lo sviluppo e la progressione del cancro. Quindi, tumori solidi promuovono l'infiltrazione di popolazioni leucocitarie, comprendenti cellule mieloidi associate al tumore (TAMCs). I TAMCs rappresentano un gruppo di popolazioni fagocitarie eterogenee, derivanti da un precursore mieloido comune (CMP), che orchestrano vari aspetti dello sviluppo tumorale, tra cui: alterazione delle risposte immuno-adattative, immunosoppressione, crescita cellulare, angiogenesi, deposizione di matrice e rimodellamento, costruzione di una nicchia metastatica e formazione di metastasi. Diversi elementi indicano che i TAMCs mostrano plasticità e/o eterogeneità funzionale, suggerendo che fattori tumorali promuovono la loro "riprogrammazione" funzionale, favorendo attività pro-tumorali. Mentre studi recenti hanno cercato di chiarire il ruolo dei segnali del microambiente nella riprogrammazione delle cellule mieloidi, l'interazione tra le cellule tumorali, l'immunità innata e adattativa sta emergendo come un evento cruciale nella riprogrammazione dei TAMCs. Il contenuto cellulare dei tumori solidi comprende cellule tumorali e un gruppo eterogeneo di popolazioni cellulari, che comprendono fibroblasti, cellule endoteliali, periciti e leucociti. Tra i leucociti, le popolazioni mieloidi rappresentano una componente importante, in termini di numero e di funzioni, che sostiene la crescita e progressione tumorale. Siccome i macrofagi sono parte della prima linea dei meccanismi di difesa del sistema immunitario (immunità innata), il ruolo di protumorale delle cellule mieloidi associate al tumore (TAMCs) appare un paradosso dell'immunità, che trova la sua spiegazione nella "plasticità" funzionale di queste cellule, definita come la capacità di esprimere diversi programmi funzionali in risposta a segnali diversi (es. citochine, fattori di crescita) e/o condizioni diverse del microambiente (es. acidosi, alta pressione interstiziale, bassi livelli di glucosio). Di conseguenza, nuova attenzione è diretta verso i meccanismi e le molecole che guidano le funzioni dei TAMCs. I TAMCs comprendono almeno quattro diverse popolazioni mieloidi:

- macrofagi associati al tumore (TAM), considerati orchestratori cruciali dell'infiammazione legata al cancro, che promuovono angiogenesi, immunosoppressione, rimodellamento dei tessuti e la formazione di metastasi;
- i monociti angiogenici che esprimono la chinasi endoteliale Tie2 (recettore dell'angiopoietina), che giocano un ruolo chiave nell'angiogenesi tumorale;
- le popolazioni Ly6G e Ly6C di cellule mieloidi soppressorie immature (MD-SCs), che sopprimono le funzioni delle cellule T, accumulandosi soprattutto nel sangue e negli organi linfoidi durante la crescita del tumore;
- neutrofili associati al tumore (TAN) che, nonostante la loro breve vita, sono stati recentemente descritti partecipare alla promozione tumorale mediante l'espressione di fattori pro-angiogenici.

I TAMCs originano nel midollo osseo, nel quale le cellule staminali ematopoietiche (HSC) differenziano in comuni precursori mieloidi (CMP), che successivamente danno origine a diversi sottotipi di cellule circolanti: le cellule mieloidi immature (IMC), che possono essere ulteriormente essere suddivise in sottopopo-

lazioni granulocitiche (CD11b⁺/Ly6G⁺) e monocitiche (CD11b⁺/Ly6C⁺), monociti (CD11b⁺/Gr1⁺/F4/80⁺/CCR2⁺), monociti Tie2⁺ (CD11b⁺/Gr1^{ow}/Tie2⁺) e neutrofili (CD11b⁺Ly6G⁺). I tumori secernono fattori che sostengono la mielopoiesi, promuovendo il reclutamento di cellule circolanti e orientando il loro differenziamento funzionale a proprio vantaggio. Le cellule dendritiche (DC) appartengono alla famiglia delle cellule mieloidi derivanti da CMP. Le cellule dendritiche associate a tumore (TADCs) in genere mostrano un fenotipo immaturo e agiscono da inibitrici della risposta antitumorale antigene specifica. L'estrema versatilità funzionale dei fagociti mononucleati è sottolineata da differenti condizioni fisiopatologiche (sepsi, cancro, obesità). Recenti studi hanno dimostrato come diverse componenti cellulari della massa tumorale (cellule tumorali, fibroblasti, cellule immunitarie innate e adattative) convergano le loro attività al fine di promuovere programmi macrofagici associati a sviluppo tumorale. In questo scenario, nuovi sforzi sono necessari per identificare i regolatori chiave della plasticità delle cellule mieloidi durante lo sviluppo del cancro.

I macrofagi associati a tumore

I macrofagi associati ai tumore (TAM) costituiscono la principale componente dell'infiltrato leucocitario delle neoplasie e sono effettori chiave della infiammazione tumore-relata. Essi derivano dai monociti circolanti e sono attratti all'interno della massa tumorale da citochine dotate di attività chemiotattica, denominate chemochine. Le cellule tumorali producono diverse chemochine, in particolare la chemochina nota come Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1), ora denominata CCL2. La quantità di TAM nei tumori è regolata dai livelli di MCP1/CCL2 e di altre chemochine, espresse sia dalle cellule tumorali che dall'infiltrato infiammatorio stesso. Inoltre molti tumori producono fattori di crescita, come il Colony Stimulating Factor (CSF) macrofagico (M-CSF), che prolungano la sopravvivenza dei macrofagi all'interno dei tumori. Se opportunamente stimolati da citochine immunostimolatorie, quali Interferone (IFN) γ , i macrofagi sviluppano un fenotipo M1 o "classico" e sono potenzialmente in grado di esercitare attività citotossica nei confronti delle cellule tumorali o di attivare circuiti di distruzione tissutale. Tuttavia nel tessuto tumorale non è generalmente presente IFN γ , ma altre citochine che indirizzano i macrofagi ad un fenotipo di tipo M2 o "alternativo" e caratterizzato da attività pro-tumorali. I TAM infatti producono fattori di crescita per le cellule tumorali e per i vasi sanguigni. L'ipotesi della "bilancia macrofagica" esprime questa ambivalenza e ambiguità del ruolo dei macrofagi nel controllo della crescita neoplastica (Fig. 1). La "bilancia macrofagica" può avere effetti netti diversi in stadi diversi della crescita del tumore o in un contesto terapeutico. Nei primi stadi della cancerogenesi le risposte innate hanno un ruolo positivo e sono probabilmente coinvolte nell'attivazione di una sorveglianza efficace mediata dall'immunità adattativa (es. linfociti T citotossici) che elimina le cellule tumorali. Quando il tumore è ormai stabilizzato e le cellule neoplastiche sono sfuggite al controllo immunologico, l'infiammazione persistente sostenuta dai TAM favorisce la crescita delle cellule tumorali, l'angiogenesi e la metastatizzazione.

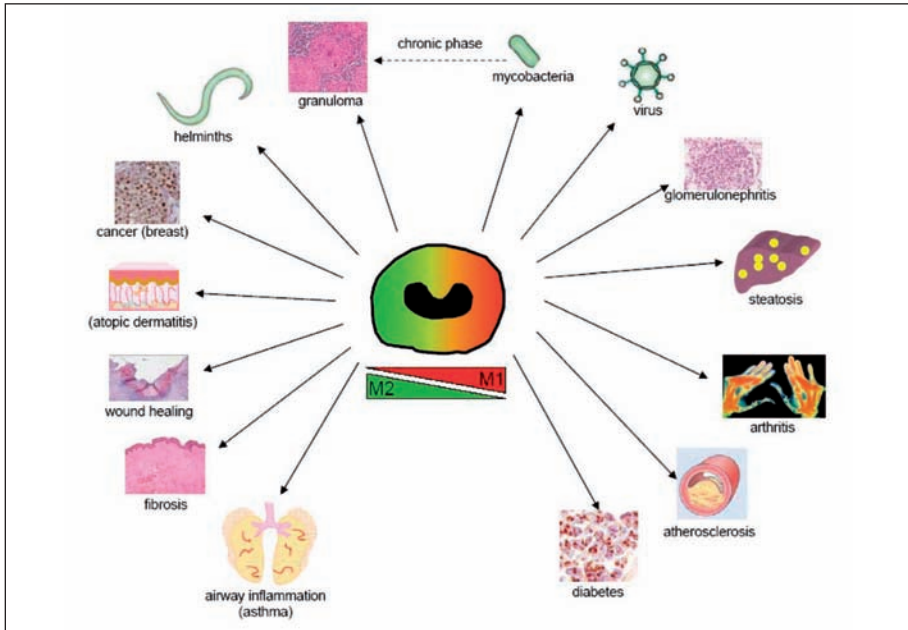


Fig. 1 - Rappresentazione schematica di plasticità e la polarizzazione dei macrofagi in patologia. Cambiamenti dinamici della polarizzazione dei macrofagi possono verificarsi nel tempo con l'evoluzione della patologia: ad esempio, una conversione di polarizzazione da M1 a M2 caratterizza il passaggio dalla prima fase a quelle croniche di varie infezioni. Inoltre, fenotipi misti o popolazioni con fenotipi differenti possono coesistere.

I macrofagi come bersaglio terapeutico

Nuove terapie mirate sui macrofagi stanno muovendo i primi passi nell'arena clinica. Inoltre, approcci terapeutici originariamente progettati contro altri bersagli si sono rivelati in grado di influenzare l'attivazione e polarizzazione dei macrofagi. Fattori chemiotattici per i monociti includono membri della superfamiglia delle chemochine, CCL2/MCP-1 in particolare, e fattori di crescita che interagiscono con i recettori tirosina chinasi, CSF-1R e VEGFR. Sono stati generati inibitori del recettore di CSF-1 (c-fms), con attività anti-angiogenica e anti-metastatica nella leucemia mieloide acuta e in modelli di melanoma. Chemochine e CSF-1 non hanno solo attività chemiotattica sui monociti, ma ne promuovono anche la polarizzazione M2. Anticorpi diretti contro CCL2/CCR2 si sono dimostrati attivi nel cancro della prostata e del seno. Un inibitore di CCL2 (bindarit) si è dimostrato attivo in modelli preclinici di cancro e patologie vascolari, con conseguente inibizione del reclutamento dei monociti. Questo agente è ora in fase di valutazione per l'uso clinico. Anticorpi e oligonucleotidi antisense anti-CSF-1 sopprimono l'infiltrazione dei macrofagi e la crescita di tumori mammari xenografts. Inibitori di VEGF possono diminuire il reclutamento dei macrofagi e questo effetto può contribuire alla loro attività anti-angiogenica. Al contrario, in risposta a chemioterapia neoadiuvante si è osservato un cambiamento della composizione del microambiente tumorale

immunitario in pazienti con cancro al seno, con maggiore percentuale di cellule mieloidi infiltranti. Recenti risultati suggeriscono che in situ, la proliferazione è un fattore determinante di accumulo dei macrofagi. In particolare, IL-4 è stata dimostrata sostenere la proliferazione dei macrofagi. Il riorientamento della polarizzazione dei macrofagi è considerato una strategia chiave in molte patologie. Fenotipi macrofagici polarizzati sono reversibili in vitro e in vivo. In un ampio studio clinico in pazienti con tumore ovarico, IFN γ si è dimostrato in grado di riattivare attività tumoricide nei TAM, associato a risposta clinica. In un modello di adenocarcinoma pancreatico duttale, un agonista di CD40 ha promosso un notevole effetto anti-tumorale associato a alta espressione di marcatori M1 (MHC di classe II e CD86) nei macrofagi. Agonisti PPAR γ (tiazolidinedioni) sono da tempo utilizzati nel trattamento del diabete. Le evidenze che collegano PPAR γ alla polarizzazione M2 e quindi al ruolo omeostatico dei macrofagi associati a tessuto adiposo (ATM) gettano nuova luce sulla loro modalità di azione. Altri agenti terapeutici segnalati per influenzare la polarizzazione dei macrofagi sono l'acido zoledronico (un agente usato per la prevenzione delle recidive di tumore al seno e metastasi ossee), statine, la trabectedina e ligandi TLR (ad esempio imiquimod e CpG).

Conclusioni

Sono stati compiuti progressi nella definizione delle reti molecolari che sottendono l'attivazione dei macrofagi polarizzati. Determinanti molecolari di polarizzazione M1 e M2 sono membri delle famiglie di fattori trascrizionali PPAR, KLFs, IRF, STAT, NF- κ B, e HIF. La polarizzazione funzionale dei macrofagi è stata osservata in vivo in condizioni fisiologiche (embriogenesi, gravidanza) e patologiche (infiammazione cronica, riparazione dei tessuti, disordini metabolici e vascolari, infezioni e cancro). È stato ampiamente dimostrato che i macrofagi sono una componente fondamentale di tutti questi processi (Fig. 1). In condizioni patologiche come le infezioni parassitarie, allergie, e molti tumori, i fenotipi funzionali dei macrofagi in vivo rispecchiano stati funzionali canonici (M1 e M2 o M2-like). Tuttavia in un certo numero di condizioni patologiche, come i disturbi neurodegenerativi, questo non è vero, e popolazioni di macrofagi esprimono fenotipi misti o unici. Ciò indica che l'analisi della plasticità dei macrofagi deve essere approfondita nelle diverse condizioni patologiche. Il "macrofago" come bersaglio terapeutico deve quindi essere ulteriormente esplorato. L'identificazione dei meccanismi e molecole associate con plasticità e attivazione dei macrofagi polarizzati fornisce una base per nuove strategie diagnostiche e terapeutiche.

Bibliografia

1. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *Journal of Clinical Investigation*. 2012; 122: 787-95.
2. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunctions during tumor development. *Journal of Clinical Investigation*. 2007; 117: 1155-66.

