

CROSS-TALK TRA CELLULE IMMUNI E CELLULE CANCEROSE NEL CONTROLLO DEL POTENZIALE METASTATICO TUMORALE

Stefania Parlato, Fabrizio Mattei, Giovanna Schiavoni, Maria Buoncervello, Paola Borghi, Elena Toschi, Giulia Romagnoli, Immacolata Pietraforte, Irene Canini, Debora Salerno, Laura Abalsamo, Filippo Belardelli, Lucia Gabriele

Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

La formazione delle metastasi è un fenomeno progressivo molto complesso determinato dall'interconnessione di molti processi biologici, tra i quali giocano un ruolo determinante la capacità di migrazione e invasione delle cellule cancerose e la competenza delle cellule del sistema immune di riconoscere ed eliminare le cellule tumorali stesse (1). La prevalenza dell'uno o dell'altro processo, determinata dal continuo *cross-talk* tra cellule tumorali e immuni, sia a livello del microambiente tumorale che a livello sistemico, determina rispettivamente la dispersione di cellule neoplastiche in altri tessuti, anche molto lontani da quelli di origine, oppure l'arresto del processo canceroso (2). Il microambiente tumorale è ritenuto un regolatore della progressione del cancro grazie alla presenza di diverse cellule immuni, tra cui le cellule dendritiche (DC) che attraverso la loro attività funzionale e la secrezione di diversi fattori proteici, tra cui citochine e chemochine, influenzano i processi biologici delle cellule tumorali e innescano la risposta antitumorale specifica dei linfociti T (3). Sebbene sia comunemente riconosciuto che le interazioni tra cellule tumorali e immuni siano fondamentali nello sviluppo dei tumori, i meccanismi cellulari e molecolari che regolano le modificazioni del microambiente tumorale devono ancora essere chiariti. Nel microambiente tumorale operano innumerevoli componenti governate da diversi fattori, tra cui citochine, fattori regolatori e stimoli esterni, tutti rigorosamente operanti in un network interconnesso. Recentemente, i microRNA (miR) sono stati descritti come regolatori chiave di molti processi biologici, tra cui lo sviluppo del sistema immunitario e l'induzione di risposte immunitarie a tumori e patogeni (4). Gli interferoni (IFN) e i segnali cellulari da essi attivati hanno un ruolo fondamentale nell'immunità innata e adattativa ai tumori, e recentemente è stato riportato che geni indotti dagli IFN e coinvolti nella risposta immunitaria sono regolati da miR (5). Scopo della nostra ricerca è chiarire le basi cellulari e molecolari che governano alcuni meccanismi alla base dell'intrigato *cross-talk* tra cellule tumorali e immuni determinando la progressione tumorale e lo sviluppo di metastasi.

Stato dello sviluppo

Gli IFN di tipo I (IFN-I) hanno un ruolo fondamentale nel determinare l'attività funzionale di alcune sottopopolazioni di DC e quindi nella stimolazione della risposta T antitumorale. In questi anni il nostro gruppo ha caratterizzato una nuova popolazione di DC generate *in vitro* a partire da monociti umani trattati con IFN- α (IFN-DC) (6, 7). Queste cellule posseggono un'elevata capacità di indurre una risposta immune protettiva nei confronti di cellule tumorali e di patogeni (8). Alcuni nostri recenti studi hanno evidenziato che le IFN-DC posseggono una

forte capacità di catturare corpi apoptotici di linfociti allogenici attraverso il recettore di membrana LOX-1 e di stimolare attraverso questa via l'attivazione di linfociti autologhi T CD8⁺ e CD4⁺ (9). A sostegno di questa peculiare capacità delle IFN-DC, utilizzando il modello di linfoma murino esprimente Ovalbumina (EG7-OVA) abbiamo dimostrato che l'IFN-I è in grado di stimolare la ritenzione di antigeni derivati da cellule tumorali apoptotiche da parte di DC che le hanno fagocitate. Questo processo porta ad una maggiore capacità delle DC di cross-presentare gli antigeni a linfociti T CD8⁺ OVA-specifici con conseguente aumento della risposta effettrice sia *in vitro* che *in vivo* (10). Nell'ambito dello studio delle attività funzionali delle IFN-DC, evidenze preliminari suggeriscono inoltre un loro ruolo nel controllo delle cellule T regolatorie (Treg) nel carcinoma del rene (RCC). Molti studi hanno evidenziato che in pazienti con RCC la frequenza delle Treg, importanti mediatori del controllo delle risposte immuni, è più elevata rispetto ad individui sani (11). I nostri dati preliminari suggeriscono che in pazienti con RCC la terapia con IFN modula l'attività delle DC.

Recentemente è stato dimostrato che DC plasmacitoidi (pDC), mediatori chiave della risposta immune innata nei confronti di patogeni per la loro peculiare potenzialità di produrre ingenti quantità di IFN-I in risposta alle infezioni, sono coinvolti anche nell'immunità tumorale (12). Dati prodotti nel nostro laboratorio dimostrano che le IFN- α -DC presentano un fenotipo simile a quello delle pDC essendo CD123⁺ e BDCA-2⁺; esse esprimono inoltre anche alcuni marcatori molecolari tipici di questa sottopopolazione di DC quali IRF8, CD2-AP, TLR-7 e TLR-9. Alla luce della stretta similitudine tra IFN- α -DC e pDC, abbiamo condotto uno studio finalizzato ad identificare marcatori molecolari condivisi associati con le attività funzionali delle due popolazioni. A tale scopo è stato analizzato il profilo di espressione di miR in IFN- α -DC e pDC. I dati ottenuti hanno dimostrato che le IFN-DC e le pDC isolate da sangue periferico condividono l'espressione di un pannello di 10 miR di cui 5 sono predetti regolare l'espressione del gene PRDM-1 codificante Blimp-1 (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*) (13). Recentemente, questa proteina è stata descritta come un regolatore trascrizionale chiave del differenziamento non solo delle plasmacellule ma anche di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ effettori e di memoria (14). I nostri dati dimostrano che, sia nelle IFN-DC che nelle pDC, i miR specifici regolatori di Blimp-1 sono soppressi con conseguente elevata espressione di Blimp-1. In particolare, è stato osservato che è proprio l'IFN- α a modulare l'espressione di questo set specifico di miR e di conseguenza di Blimp-1 (manoscritto inviato per la pubblicazione). L'IFN- α è quindi in grado di dirigere non solo il differenziamento di DC da monociti ma anche di controllare l'attività di pDC mediante la modulazione di specifici miR che a loro volta regolano l'espressione di Blimp-1, fattore chiave coinvolto nel differenziamento funzionale di molte popolazioni immuni. Nel loro insieme questi dati evidenziano le forti similitudini esistenti tra le IFN-DC e le pDC periferiche e quindi contribuiscono a migliorare l'utilizzo di queste sottopopolazioni immuni in strategie terapeutiche nell'ambito sia di malattie neoplastiche che autoimmuni. In relazione al miglioramento di protocolli terapeutici che prevedono l'utilizzo di sottopopolazioni di DC, uno studio parallelo in corso nel nostro laboratorio si propone di modificare geneticamente queste cellule con fattori che ne possano aumentare la funzionalità, quali i fattori di trascrizione membri della famiglia degli *Interferon Regulatory Factors* (IRF) IRF-8 e IRF-1, per ottenere DC più adatte alla stimolazione di una risposta antitumorale protettiva piuttosto che tollerogena.

IRF-8 svolge un doppio ruolo nella risposta antitumorale in quanto da una parte controlla la risposta immune e dall'altra è implicato nella crescita e nella differenziazione di cellule tumorali di diversa origine (15). IRF-8 governa il programma differenziativo di cellule mieloidi e pertanto topi geneticamente deleti di questo fattore (IRF-8^{-/-}) mancano di alcune sottopopolazioni di DC, tra cui le pDC e le DC CD8 α ⁺, cellule deputate alla cross-presentazione di antigeni tumorali ai linfociti T CD8⁺ durante la risposta immunitaria (16-18). D'altro canto, IRF-8 svolge attività di gene

oncosoppressore e di conseguenza topi IRF-8^{-/-} sviluppano una malattia simile alla leucemia mieloide cronica umana mentre la sua espressione determina suscettibilità all'apoptosi di cellule mieloidi (19, 20). Recentemente, è stato descritto che IRF-8 ha un ruolo critico anche nella biologia di cellule cancerose di tumori solidi e la sua mancata espressione è stata rilevata in molti carcinomi primari e correlata all'aumento del potenziale metastatico di cellule di sarcoma (21, 22). Alla luce di queste importanti evidenze, il nostro gruppo ha intrapreso esperimenti atti a valutare il ruolo di IRF-8 nel *cross-talk* tra cellule cancerose e immuni nel melanoma. In tal senso sono stati condotti esperimenti di trapianto di cellule murine di melanoma B16-F10 in topi IRF-8^{-/-} (23). I dati ottenuti hanno evidenziato che la mancata espressione di IRF-8 determina un'accelerazione della progressione e del potenziale metastatico del melanoma. Inoltre, lo studio dei meccanismi che sottendono questo nuovo ruolo di IRF-8 ha rilevato che è proprio il *cross-talk* tra cellule cancerose e immuni a determinare l'espressione di questo fattore in cellule tumorali e a caratterizzare la risposta immune antitumorale. Infatti, melanomi trapiantati in topi IRF-8^{-/-} perdono completamente l'espressione di IRF-8 e sono caratterizzati da una scarsa infiltrazione leucocitaria (linfociti T CD4⁺ e CD8⁺, DC totali e pDC) associata all'espressione di un profilo di chemochine modificato. Di grande rilevanza è l'osservazione che il ripristino forzato dell'espressione di IRF-8 nei melanomi ristabilisce un corretto *trafficking* di leucociti nel microambiente sostenuto da un assetto di chemochine ridefinito. Globalmente, questi studi rivelano che IRF-8, importante mediatore del segnale degli IFN e dell'attività funzionale di alcune sottopopolazioni di DC, rappresenta il primo descritto dei molteplici fattori che probabilmente mediano il *cross-talk* tra cellule cancerose e immuni.

I *Toll-like receptors* (TLR) sono stati descritti come potenziali candidati nel mediare la risposta innata nel microambiente tumorale (24). Alcuni di essi stabiliscono un intenso *cross-talk* con il segnale degli IFN, specialmente in particolari sottopopolazioni immunitarie come le pDC. È stato anche riportato che alcuni virus, forti induttori di IFN, interagiscono attraverso i TLR con il microambiente tumorale e ne condizionano la risposta infiammatoria (25). Data la presenza di TLR in cellule tumorali, studi recenti hanno evidenziato che segnali attivati da alcuni TLR sono coinvolti anche nei processi di tumorigenesi e progressione tumorale. Alla luce di queste evidenze abbiamo avviato uno studio che si propone di valutare l'esistenza di un *cross-talk* tra TLR2 e l'asse CXCL12/CXCR4 nella regolazione del potenziale metastatico di cellule di carcinoma mammario. A tale scopo, la capacità metastatica di linee cellulari di carcinoma mammario mediata dal *cross-talk* tra TLR2 e CXCL12/CXCR4 è stata valutata in seguito a trattamento con ligandi specifici per TLR2, quali lo zymosan e il virus HSV-1. Dati preliminari suggeriscono che le linee cellulari di carcinoma mammario non metastatiche aumentano l'espressione di TLR2 e CXCR4 dopo l'infezione con HSV-1 in associazione con un aumentato potenziale metastatico; al contrario, nelle linee cellulari invasive e altamente metastatiche non si osserva alcuna modulazione dei due recettori in seguito ad infezione. Questi dati preliminari suggeriscono che la capacità metastatica di cellule cancerose potrebbe essere modificata da un insulto esogeno, come un'infezione virale, attraverso l'attivazione dell'asse TLR2-CXCL12/CXCR4. In questo contesto, si colloca anche uno studio da poco iniziato finalizzato a correlare l'alta frequenza di adenocarcinoma in pazienti infetti con HIV-1 alla capacità del virus stesso di promuovere la trasformazione di cellule epiteliali del colon in cellule cancerose.

Conclusioni e prospettive future

I risultati delle nostre linee di ricerca dimostrano chiaramente che il *cross-talk* tra cellule cancerose e cellule immuni nel microambiente tumorale è governato da molteplici fattori tra cui gli IFN, che controllano l'attività funzionale di alcune sottopopolazioni di DC, determinanti nella generazione di una risposta antitumorale protettiva caratterizzata da linfociti T CD8⁺ e

CD4⁺ specifici per antigeni tumorali. Questo processo avviene attraverso l'induzione di molecole con attività regolatoria, quali miR e il fattore di trascrizione IRF-8, che determinano l'espressione di geni specifici implicati in molti processi immunologici caratterizzando la risposta antitumorale. Contemporaneamente i segnali modulati dagli IFN e da altri stimoli esogeni, quali infezioni virali, agiscono direttamente sulla cellula tumorale, modificandone le proprietà di crescita e determinandone il potenziale metastatico. Anche in questo caso, i dati ottenuti dal nostro gruppo suggeriscono un coinvolgimento di molecole con attività regolatoria come IRF-8. Di notevole interesse è il fatto che tutti questi eventi biologici si verificano in stretta interconnessione definendo un continuo *cross-talk* tra le cellule cancerose e immuni e determinando in ultima analisi il decorso del processo canceroso (Figura 1).

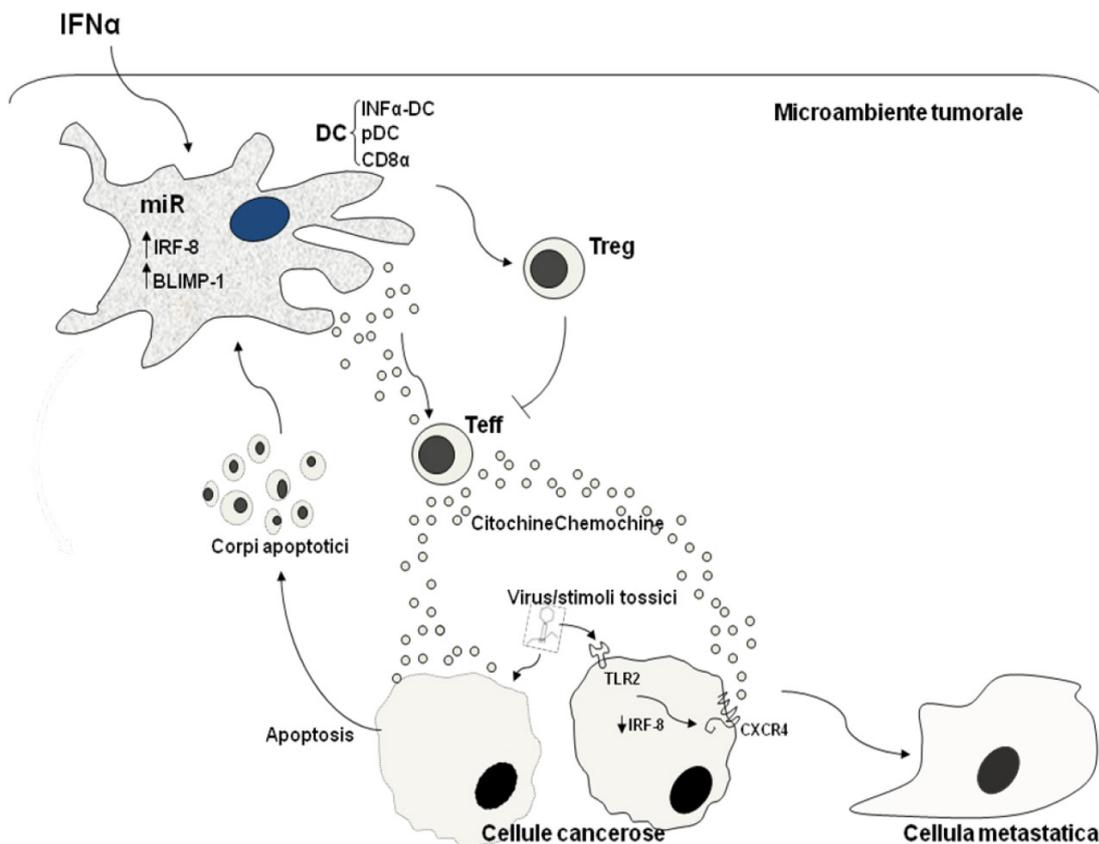


Figura 1. Il potenziale metastatico tumorale è determinato dal *cross-talk* tra cellule immuni e cellule cancerose. Rappresentazione schematica dell'attività degli IFN e dei segnali cellulari ad essi correlati nel *cross-talk* tra cellule cancerose e cellule immuni

Lo sviluppo dei nostri progetti sarà finalizzato a definire le basi cellulari e molecolari che governano l'attività degli IFN, con particolare attenzione all'IFN-I, nel determinare il *cross-talk* tra cellule cancerose e cellule immuni nel microambiente tumorale controllando in questo modo il potenziale metastatico delle cellule tumorali. Particolare attenzione verrà rivolta all'induzione e allo studio del ruolo di miR nella risposta antitumorale diretta e immunomediata governata dai segnali degli IFN e dei fattori trascrizionali da essi controllati. Brevemente verranno studiate le attività funzionali e la loro regolazione, attraverso l'espressione di miR e di geni bersaglio

specifici, di IFN-DC e pDC con particolare attenzione al loro *cross-talk* con linfociti T CD8⁺ e CD4⁺ e Treg in tumori con alto potenziale metastatico, tra cui il melanoma e il RCC. Verranno eseguiti studi per migliorare le attività funzionali di IFN-DC, importante strumento terapeutico nell'immunoterapia di diverse neoplasie, attraverso la modulazione di IRF-8, fattore chiave del differenziamento e dell'attività funzionale di alcune sottopopolazioni di DC. In parallelo, proseguiranno gli studi mirati a definire i fattori controllati da IRF-8 che, attraverso la modulazione del *cross-talk* tra cellule cancerose e immuni, determinano il potenziale metastatico delle cellule tumorali. Infine, verranno studiati i segnali molecolari attivati da agenti esterni, quali i virus, coinvolti nella determinazione del potenziale metastatico di cellule tumorali in neoplasie quali il carcinoma mammario e del colon. Nel loro complesso questi studi, oltre a chiarire alcuni meccanismi che sottendono il *cross-talk* tra cellule cancerose e immuni, permetteranno di migliorare le strategie terapeutiche basate sull'utilizzo di DC e di identificare nuovi potenziali biomarcatori del decorso e della risposta ad immunoterapie di alcune malattie oncologiche.

Bibliografia

1. Rajput S, Wilber A. Roles of inflammation in cancer initiation, progression, and metastasis. *Front Biosci* (Schol Ed) 2010;2:176-83.
2. Solinas G, Marchesi F, Garlanda C, Mantovani A, Allavena P. Inflammation-mediated promotion of invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29:243-48.
3. Sautes-Fridman C, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Fisson S, Fridman WH, Cremer I, Dieu-Nosjean MC. Tumor microenvironment is multifaceted. *Cancer Metastasis Rev* 2011;30:13-25.
4. Davidson-Moncada J, Papavasiliou FN, Tam W. MicroRNAs of the immune system: roles in inflammation and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1183:183-94.
5. David M. Interferons and microRNAs. *J Interferon Cytokine Res* 2010;30:825-28.
6. Santini SM, Lapenta C, Logozzi M, Parlato S, Spada M, Di Pucchio T, Belardelli F. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity *in vitro* and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med* 2000;191:1777-788.
7. Gabriele L, Borghi P, Rozera C, Sestili P, Andreotti M, Guarini A, Montefusco E, *et al.* IFN-alpha promotes the rapid differentiation of monocytes from patients with chronic myeloid leukemia into activated dendritic cells tuned to undergo full maturation after LPS treatment. *Blood* 2004;103:980-87.
8. Santini SM, Lapenta C, Santodonato L, D'Agostino G, Belardelli F, Ferrantini M. IFN-alpha in the generation of dendritic cells for cancer immunotherapy. *Handb Exp Pharmacol* 2009:295-317.
9. Parlato S, Romagnoli G, Spadaro F, Canini I, Sirabella P, Borghi P, Ramoni C, *et al.* LOX-1 as a natural IFN-alpha-mediated signal for apoptotic cell uptake and antigen presentation in dendritic cells. *Blood* 2010;115:1554-63.
10. Lorenzi S, Mattei F, Sistigu A, Bracci L, Spadaro F, Sanchez M, Spada M, *et al.* Type I IFNs control antigen retention and survival of CD8alpha(+) dendritic cells after uptake of tumor apoptotic cells leading to cross-priming. *J Immunol* 2011;186:5142-50.
11. Itsumi M, Tatsugami K. Immunotherapy for renal cell carcinoma. *Clin Dev Immunol* 2010;2010:284581.
12. Lande R, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1183:89-103.
13. Bikoff EK, Morgan MA, Robertson EJ. An expanding job description for Blimp-1/PRDM1. *Curr Opin Genet Dev* 2009;19:379-85.

14. Crotty S, Johnston RJ, Schoenberger SP. Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nat Immunol* 2010;11:114-20.
15. Abrams SI. A multi-functional role of interferon regulatory factor-8 in solid tumor and myeloid cell biology. *Immunol Res* 2010;46:59-71.
16. Schiavoni G, Mattei F, Sestili P, Borghi P, Venditti M, Morse HC, 3rd, Belardelli F, *et al.* ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells. *J Exp Med* 2002;196:1415-25.
17. Schiavoni G, Mattei F, Borghi P, Sestili P, Venditti M, Morse HC, 3rd, Belardelli F, *et al.* ICSBP is critically involved in the normal development and trafficking of Langerhans cells and dermal dendritic cells. *Blood* 2004;103:2221-28.
18. Mattei F, Schiavoni G, Borghi P, Venditti M, Canini I, Sestili P, Pietraforte I, *et al.* ICSBP/IRF-8 differentially regulates antigen uptake during dendritic-cell development and affects antigen presentation to CD4+ T cells. *Blood* 2006;108:609-17.
19. Holschke T, Lohler J, Kanno Y, Fehr T, Giese N, Rosenbauer F, Lou J, *et al.* Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene. *Cell* 1996;87:307-17.
20. Gabriele L, Phung J, Fukumoto J, Segal D, Wang IM, Giannakakou P, Giese NA, *et al.* Regulation of apoptosis in myeloid cells by interferon consensus sequence-binding protein. *J Exp Med* 1999;190:411-21.
21. Lee KY, Geng H, Ng KM, Yu J, van Hasselt A, Cao Y, Zeng YX, *et al.* Epigenetic disruption of interferon-gamma response through silencing the tumor suppressor interferon regulatory factor 8 in nasopharyngeal, esophageal and multiple other carcinomas. *Oncogene* 2008;27:5267-76.
22. Yang D, Thangaraju M, Greenelch K, Browning DD, Schoenlein PV, Tamura T, Ozato K, *et al.* Repression of IFN regulatory factor 8 by DNA methylation is a molecular determinant of apoptotic resistance and metastatic phenotype in metastatic tumor cells. *Cancer Res* 2007;67:3301-09.
23. Mattei F, Schiavoni G, Spada M, Gabriele L. Role of IRF-8 in the interface of melanoma tumor cell-immune system interaction. *Eur J Immunol* 2009;s 1/09. p. S621.
24. Ioannou S, Voulgarelis M. Toll-like receptors, tissue injury, and tumorigenesis. *Mediators Inflamm* 2010;2010:581837.
25. Hirsch I, Caux C, Hasan U, Bendriss-Vermare N, Olive D. Impaired Toll-like receptor 7 and 9 signaling: from chronic viral infections to cancer. *Trends Immunol* 2010;31:391-97.