

Id. proposta – linea di attività: AIM1881755 -1

Area: “Salute”

Mesi all'estero: 6

S.C. 06/N1 “Scienze delle Professioni Sanitarie e delle Tecnologie Mediche Applicate”

posti RTDA n. 1

S.S.D. MED/50 “Scienze Tecniche Mediche Applicate”

Sintetica descrizione dello stato dell'arte e delle collaborazioni eventualmente già in essere

Titolo: **Obesità e cancro: meccanismi molecolari alla base del potenziale tumorigenico e metastatico.**

Negli ultimi anni il numero di casi di obesità è in costante aumento, con oltre 600 milioni di soggetti aventi un indice di massa corporea superiore a 30 kg/m². L'obesità, data la correlazione con l'insorgenza di patologie metaboliche, cardiovascolari e oncologiche (inclusi il tumore al colon (CRC) e alla mammella (BC)), è diventato un tema fondamentale negli interventi di salute pubblica a livello mondiale. Lo studio della correlazione tra obesità e cancro ha portato negli ultimi anni a coniare il termine “adiponcosi”, nato dalla fusione delle due parole latine adiposis ed oncosis.

Tuttavia, i meccanismi molecolari alla base di questo fenomeno non sono del tutto chiari. Il principale mediatore dell'insorgenza e progressione tumorale sembra essere il pronunciato microambiente infiammatorio creato dall'accumulo di tessuto adiposo (1). L'infiammazione cronica risulta essere di particolare importanza in quanto costituisce una caratteristica peculiare sia dei disordini metabolici che dei tumori, due patologie sulle quali il Dipartimento proponente possiede conclamata esperienza. Il tessuto adiposo è oggi considerato come un vero e proprio organo endocrino, grazie al rilascio di specifiche citochine chiamate “adipochine”, che possono creare un ambiente permissivo per la crescita e disseminazione delle cellule tumorali (2,3). Numerosi studi hanno dimostrato che i tumori contengono una sottopopolazione di cellule con caratteristiche staminali, chiamate cellule staminali tumorali (CSC), le quali sono responsabili della formazione e progressione del tumore (4,5). Risulta dunque essenziale comprendere come il fenotipo staminale tumorale venga indotto dal tessuto adiposo e quali siano le adipochine responsabili di questo processo. In questo contesto, abbiamo dimostrato che le CSC di colon-retto (CR-CSC) acquisiscono un potenziale metastatico ad opera dell'HGF con conseguente attivazione del pathway di PI3K/AKT, portando ad aumento di espressione del marcatore di staminalità CD44v6 (5). Inoltre, la secrezione autocrina e paracrina dell'IL-4, da parte delle cellule staminali mesenchimali derivanti dal tessuto adiposo (AD-MSC), promuove la progressione del tumore e la refrattarietà alle comuni terapie anti-tumorali del BC e CRC (6,7). I nostri dati preliminari mostrano che la co-coltura di AD-MSC e CSC aumenta l'attività del pathway di PI3K/AKT e l'espressione di CD44v6 nelle CR-CSC. Inoltre il mezzo condizionato (CM) delle

AD-MSC aumenta il potenziale proliferativo ed invasivo delle CSC in vitro, attraverso IL-6 e HGF (Figura 1A), molecole coinvolte nella promozione del potenziale tumorigenico e metastatico delle CR-CSC e CSC di mammella (BCSC) (5,8,9).

Con questo progetto intendiamo approfondire il ruolo che ciascuna di queste citochine secrete dalle AD-MSC svolge nella regolazione della proliferazione, invasione e capacità tumorigenica e metastatica delle CR/BCSC. Andremo a valutare l'attivazione di pathway di trasduzione del segnale

quali NF- κ B, JAK/STAT e p38MAPK. Inoltre testeremo in vitro ed in vivo l'effetto dell'inibizione dei pathway sopra citati e delle citochine e gli effetti sulla tumorigenesi e formazione di metastasi. Inoltre, dato il ruolo delle adipochine nel modulare negativamente le difese del sistema immunitario contro i tumori, adatteremo degli approcci combinati immunoterapici al fine di ristabilire la risposta immunitaria contro le CR/BCSC.

Il raggiungimento degli obiettivi trarrà vantaggio dalla duratura e proficua collaborazione di questo Dipartimento con esperti di fama mondiale nello studio delle CR/BCSC e del ruolo che le citochine pro-infiammatorie giocano nel processo di tumorigenesi e formazione di metastasi (Prof. Max Wicha, University of Michigan (USA); Prof. Hasan Korkaya, University of Augusta (USA); Prof. Jan Paul Medema, University of Amsterdam (The Netherlands)).

Descrizione delle attività previste

Le CSC guidano l'insorgenza e della progressione tumorale, così come la chemioresistenza. Le adipochine possono influenzare il comportamento delle CSC indirizzandole verso un fenotipo metastatico. Il tessuto adiposo è costituito per un terzo da adipociti maturi e per la restante parte da AD-MSK, cellule T regolatorie (Treg), cellule endoteliali, fibroblasti e macrofagi. Le AD-MSK grazie alla loro attività paracrina/endocrina regolano importanti pathway molecolari nelle CSC coinvolti nella proliferazione, migrazione e resistenza alle terapie. I risultati del presente progetto ci permetteranno di comprendere meglio la relazione tra il tessuto adiposo e le CSC e di identificare possibili target molecolari per il disegno di nuove strategie terapeutiche di tipo onco-immunologico nei due tumori maggiormente dipendenti dall'obesità quali il CRC ed il BC.

Obiettivo 1. Studio del ruolo delle adipochine sul potenziale tumorigenico e metastatico delle CR/BCSC.

Il tessuto adiposo è composto da tessuto adiposo bianco (WAT) viscerale (VAT) e sottocutaneo (SAT), fondamentale per l'accumulo di grasso nell'organismo, tessuto adiposo bruno (BAT) che attiva la termogenesi indotta dal freddo, ed il tessuto adiposo beige, con caratteristiche intermedie tra WAT e BAT. L'obesità provoca profondi cambiamenti nella struttura del tessuto adiposo, con conseguenti effetti sulla sua funzione. In particolare, il SAT e il VAT reagiscono diversamente all'overnutrizione, con l'attivazione di ipertrofia da parte degli adipociti maturi presenti nel SAT, che esclusivamente nel VAT viene accompagnata da iperplasia a carico delle cellule mesenchimali adipose, responsabili della produzione di adipochine. Per questo motivo il nostro progetto si focalizzerà sullo studio delle cellule mesenchimali adipose di origine viscerale.

L'attività paracrina delle linee di AD-MSK di VAT è già stata nostro oggetto di studio, in quanto abbiamo dimostrato che le AD-MSK di VAT sono caratterizzate da alta produzione di citochine coinvolte nella promozione dei processi infiammatori, di tumorigenesi e di formazione di metastasi (6). Al fine di valutare il differente pattern di secrezione di adipochine da parte del tessuto adiposo di pazienti obesi versus soggetti normopeso, effettueremo degli studi retrospettivi sulle linee già caratterizzate (Figura 1B), tramite richiesta di BMI ai clinici coinvolti nel recupero dei campioni di adipe. In particolare, valuteremo l'effetto di IL-6, IL-8 ed HGF, sulla proliferazione e sull'acquisizione di tratti mesenchimali (EMT) delle CR/BCSC, precedentemente isolate e caratterizzate (Figura 1C) tramite saggi in vitro. I meccanismi molecolari verranno studiati tramite analisi di trascrittomica e proteomica (RNA-seq, real-time PCR, fosfoproteomica e western blot). I risultati ottenuti permetteranno di identificare geni cruciali nel processo di proliferazione e migrazione cellulare, regolati dal tessuto adiposo. I risultati saranno validati tramite saggi in vivo.

In particolare le CR/BCSC, in presenza delle AD-MSC (VAT di pazienti obesi versus soggetti normopeso) verranno inoculate in rapporto 3:1 ortotopicamente in topi immunocompromessi (NOD/SCID) sia in colon che in mammella (entrambi i modelli di inoculo ortotopico sono procedure consolidate nei nostri laboratori (5,10)). Al fine di permetterne il monitoraggio in vivo, mediante tecniche di imaging molecolare (PhotonIMAGER, Biospace Lab), e successive analisi ex vivo, le CSC verranno trasdotte con un vettore codificante la luciferasi e la GFP, mentre le AD-MSC saranno trasdotte con un vettore codificante l'RFP. Gli xenograft verranno utilizzati per condurre analisi istologiche ed estrazione di DNA/RNA/proteine e per l'isolamento cellulare. Analisi comparative trascrittomiche e proteomiche verranno svolte paragonando le CSC e le AD-MSC parentali e quelle derivate da xenograft. Queste analisi ci permetteranno di identificare le citochine coinvolte nell'induzione di un fenotipo metastatico e i pathway da esse regolati. Specifici pannelli di inibitori di citochine e relativi pathway, e combinazioni di essi, verranno saggiati in vitro per la loro efficacia nel ridurre la vitalità delle CR/BCSC, in presenza di CM di AD-MSC di VAT. I composti/combinazioni più promettenti verranno saggiati in vivo.

Obiettivo 2. Analisi del ruolo delle adipochine nella risposta immunitaria nei confronti delle CR/BCSC.

La secrezione di adipochine nel microambiente tumorale regola la risposta del sistema immunitario nei confronti delle cellule tumorali. Abbiamo già dimostrato che la secrezione di IL-4 da parte delle AD-MSC promuove la crescita delle BCSC e ne aumenta il potenziale invasivo grazie all'attivazione dei pathway di NF- κ B, ERK e p38MAPK. Inoltre l'IL-4 riduce le risposte immunitarie anti-tumorali diminuendo il numero di linfociti T (LT) citotossici (CTL) CD8⁺ (6). I nostri dati preliminari mostrano inoltre che il blocco dell'azione dell'IL-4, mediante l'IL-4 Double Mutant (IL-4DM, antagonista del recettore dell'IL-4) porta ad un aumento sensibile nella produzione di IL-17 da parte delle BCSC e delle AD-MSC (Figura 1D). Il ruolo dell'IL-17 nella risposta immunitaria ai tumori è ancora controverso. In particolare, è stato dimostrato che l'IL-17 prodotta dai LT Th17 induce sui fibroblasti la produzione di IL-6 e VEGF, promuovendo la crescita tumorale, la formazione di metastasi e l'angiogenesi. Contrariamente i LT Th17 possono potenziare l'azione dei CTL, delle cellule natural killer e dei neutrofili e possono incrementare la secrezione di IL-12 dai macrofagi con conseguente attivazione dei LT Th17 (11). In questo contesto, ci proponiamo di approfondire il ruolo dell'IL-4DM nella risposta immunitaria anti-tumorale. Allo stesso modo, al fine di ottenere un effetto combinato diretto e indiretto sulle CSC, verranno saggiati gli effetti degli inibitori di IL-6 e IL-8 sulla popolazione linfocitaria.

I LT verranno isolati dal sangue di donatori sani utilizzando il Depletion Dynabeads. La popolazione di LT verrà usata per saggi funzionali e molecolari. Gli esperimenti saranno condotti mediante saggi di co-cultura di LT, AD-MSC RFP⁺ (o utilizzando il CM delle AD-MSC) e CR/BCSC GFP⁺, per valutare la vitalità di quest'ultima popolazione cellulare, tramite staining con 7-AAD. Successivamente caratterizzeremo fenotipicamente la popolazione di LT al fine di discriminare la componente di LT CD4⁺ o CD8⁺, CD4⁺ Th1/Th2/Th17 e Treg. Valuteremo dunque la percentuale di CTL CD8⁺ attivati che esprimono IFN γ . Studieremo l'azione dell'attivazione dei pathway del segnale quali MAPK/ERK, STAT6, NF- κ B nei LT e nelle CSC. Al fine di identificare le adipochine responsabili degli effetti sopracitati, valuteremo l'effetto dell'inibizione di IL-6, IL-8 e IL-17 nella regolazione del fenotipo dei LT e conseguente riconoscimento/uccisione delle CSC. È stato infatti ampiamente dimostrato

che le cellule tumorali possono sfuggire all'azione dei CTL attraverso l'espressione di PD-L1 che, legandosi al PD-1 presente sui linfociti, ne impedisce la funzione. Abbiamo già dimostrato che l'IL-4DM diminuisce l'espressione di PD-1 sulla superficie dei CTL e pertanto ne potrebbe incrementare l'azione citotossica (6). Dati i promettenti risultati della combinazione di farmaci anti-tumorali inibitori di checkpoint nel CRC e BC, ci proponiamo di valutare l'efficacia dell'IL4-DM in combinazione con l'Ipilimumab (inibitore di CTLA-4). Inoltre valuteremo l'effetto dell'inibizione del pathway di IL-6 (Tocilizumab) e dell'IL-8 (Reparixin) nel modulare l'espressione di PD-1 sui LT ed il loro eventuale utilizzo in combinazione con l'immunoterapia.

Aspetti di coerenza della richiesta con l'area di specializzazione prevalente

Negli ultimi decenni in seguito ad una profonda modifica dello stile di vita e delle scelte alimentari, si è avuto un notevole incremento di patologie con un forte impatto socio-economico quali obesità, malattie cardiovascolari, tumori e sindrome metabolica. L'obesità costituisce il secondo fattore di rischio per l'insorgenza del BC ed il CRC. In coerenza con il tema salute, questo progetto si propone di approfondire le conoscenze sulla correlazione tra obesità e cancro, promuovendo l'utilizzo di nuove ed efficaci terapie anti-tumorali, come l'immunoterapia, nonché di fornire nuove evidenze sulla necessità di prevenire l'obesità quale fattore contribuente dell'insorgenza dei tumori. Per il conseguimento degli obiettivi previsti, grazie anche all'esperienza acquisita negli anni e alle sempre più avanzate tecnologie esistenti nel Dipartimento proponente, si richiede la dotazione aggiuntiva di due ricercatori a tempo determinato da indirizzare alla mobilità internazionale (linea 1). I due ricercatori, con una consolidata esperienza nel campo della ricerca oncologica ed in particolare sulle CSC ed il microambiente tumorale, dovranno possedere ottime capacità di lavoro di gruppo ed autonomo, di organizzare la ricerca e di seguirne i risultati. Dovranno altresì avere padronanza nella biologia cellulare, immunofluorescenza ed immunistoichimica, citofluorimetria, microscopia confocale, biologia molecolare e saggi in vivo di tumorigenicità. E' richiesta inoltre ottima padronanza della lingua inglese.

Questo progetto è in accordo con i principi orizzontali della programmazione comunitaria che prevedono l'applicazione del rispetto delle pari opportunità e della non discriminazione e del rispetto per l'ambiente, in quanto nessuna delle attività previste avrà una ricaduta dannosa sull'ambiente. Questo progetto si propone di garantire una rete di partenariato pubblico-privato, attraendo nuovi investimenti nazionali ed internazionali dal settore privato terapeutico oncologico.