**Maggio 2018**

**Relazione del progetto: “Mielopoiesi di emergenza in portatori di tumore: ruolo nello sviluppo del cancro e nell’immunoterapia antitumorale”**

**Proponente: Prof. Antonio Sica,**

Dipartimento di Scienze del Farmaco, Largo Donegani 2, 28100, Novara.

Tel.: 0321-375881; E-mail antonio.sica@uniupo.it

**Introduzione**

Gli stress immunologici, come infezioni e cancro, modificano l’ampiezza e la composizione della risposta ematopoietica, al fine di garantire un potenziamento della risposta immunitaria ad un’aumentata richiesta di difese. Tale condizione è definita “ematopoiesi di emergenza”. I tumori tuttavia possono riprogrammare la differenziazione delle cellule mieloidi, creando condizioni permissive per la progressione della malattia [1]. I meccanismi molecolari che guidano la “mielopoiesi di emergenza” in risposta alla crescita neoplastica rimangono tuttora in gran parte sconosciuti.

Studi recenti hanno dimostrato che le cellule mieloidi soppressorie (MDSC) ed i macrofagi associati a tumore (TAM), le due principali popolazioni mieloidi associate allo sviluppo tumorale, originano da un progenitore mieloide comune [2]. Queste popolazioni mostrano un’alta plasticità funzionale e rivestono un ruolo centrale nell’orchestrazione dell’infiammazione e dell’immunosoppressione associata a cancro, promuovendo la costruzione del macro- e microambiente pro-tumorale e condizionando la risposta dell’immunità specifica anti-tumorale [1,3]. La plasticità delle cellule mieloidi è esemplificata dalle risposte polarizzate M1 (macrofagi citotossici infiammatori anti-tumorali) e M2 (macrofagi immunosoppressivi pro-tumorali), che rappresentano gli estremi opposti della polarizzazione funzionale dei macrofagi [1,4]. Questi stati funzionali comportano una diversa risposta delle cellule ad una successiva stimolazione con citochine Th1 (es. Interferone-γ) o Th2 (es. Interleuchina-4) [5], potenzialmente responsabile della scarsa efficacia terapeutica di varie citochine immunostimolatorie impiegate nell’immunoterapia contro i tumori [6].

L’immunoterapia con citochine o, piu’ recentemente, con anticorpi monoclonali diretti contro recettori co-inibitori del sistema immunitario (es. CTLA4, PD-1) ha destato grandi speranze, con risposte terapeutiche significative in circa il 20% dei pazienti trattati. Un passo successivo sarà dunque la comprensione dei meccanismi alla base di questa stratificazione dei pazienti in termini di risposta all’immunoterapeutica (responder verso non responder) e l’identificazione di indicatori di risposta clinica, per l’ottimizzazione del trattamento.

A tal riguardo, sono stati riportati cambiamenti dinamici delle cellule mieloidi durante la crescita del tumore che indicano una crescente alterazione delle loro risposte durante la progressione della malattia [3]. Di interesse, queste cellule co-esprimono recettori per varie citochine immunostimolatorie e ligandi dei recettori co-inibitori CTLA4 e PD-1. Questa perturbazione tumore-dipendente delle risposte funzionali delle cellule mieloidi suggerisce una possibile implicazione nel fallimento di protocolli immunoterapeutici. A titolo di esempio, l’interferone-γ (IFN-γ), originariamente chiamato "fattore di attivazione dei macrofagi", è noto avere effetti pleiotropici sul microambiente tumorale, comprendenti l’attività anti-angiogenica, la soppressione della funzioni pro-tumorali, la promozione dell’attività tumoricida dei macrofagi e l’induzione di molecole per la presentazione degli antigeni tumorali ai linfociti T. Tuttavia, l’IFN-γ può anche stimolare attività immunosoppressorie, principalmente attraverso l'induzione di enzimi immunosoppressivi, quali l’indoleamina 2,3 diossigenasi (IDO) e l’ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS/NOS2), coinvolti rispettivamente nel catabolismo degli aminoacidi L-triptofano e L-arginina [2]. Inoltre, l’IFN-γ induce anche l'espressione della molecola immunosoppressoria PD-L1 (ligando del recettore di morte programmata-1), un nuovo bersaglio nell’immunoterapia del cancro del polmone e della mammella. Questi ruoli ambivalenti dell’IFN-γ sono stati riportati anche durante il trattamento di neoplasie umane, generando confusione e sfiducia nell’immunoterapia basata sull’utilizzo di citochine immunostimolatorie. Lo scopo del progetto è chiarire in che modo la riprogrammazione delle cellule mieloidi, che si verifica durante la crescita tumorale, possa contribuire al fallimento di protocolli immunoterapeutici.

**Risultati ottenuti**

-I nostri studi indicano un ruolo essenziale del fattore di trascrizione RORC1 nella mielopoiesi di emergenza che si osserva nei portatori di tumore. Infatti dati genetici e farmacologici prodotti nel nostro laboratorio indicano che l’inibizione dell’attività funzionale di RORC1 previene l’espansione di cellule mieloidi soppressorie (MDSC), che limitano le risposte immunitarie antitumorali. Il risultato di tale evento è quindi la riattivazione di risposte antitumorali immunospecifiche con inibizione della crescita tumorale. Tale osservazione ha posto le basi per l’utilizzo di RORC1 come bersaglio nell’immunoterapia antitumorale. Contrariamente a RORC1, il fattore trascrizionale IRF8 inibisce l’espansione di cellule mieloidi soppressorie (MDSC) e la sua inibizione genetica o farmacologica risulta quindi in una crescita neoplastica piu’ veloce e un aumento della disseminazione della malattia (aumento di metastasi). La bilancia RORC1/IRF8 sembra quindi un livello di controllo critico per la qualità e numero di cellule mieloidi immunosoppressorie. Nuovi studi nel nostro laboratorio hanno recentemente dimostrato che RORC1 agisce da regolatore negativo di IRF8, indicando quindi un’interazione funzionale fra i due fattori e suggerendo che l’inibizione farmacologica di RORC1 possa guidare un aumento di IRF8, con conseguente diminuzione di cellule MDSC e riattivazione dell’attività antitumorale.

-Per lo studio del profilo epigenetico delle cellule mieloidi soppressorie (MDSCs) abbiamo iniziato la raccolta di sangue periferico e di tessuto tumorale da pazienti con cancro del colon retto e del polmone. Intendiamo analizzare almeno 100 pazienti al fine di stabilire possibili correlazioni fra particolari assetti genetici, la risposta alla terapia e la progressione della malattia. La raccolta dei campioni e la selezione dei pazienti viene fatta in collaborazione con l’Oncologia Clinica dell’Istituto Clinico Humanitas, Rozzano, Milano. I pazienti arruolati comprendono coloro che rispondono all’immunoterapia con inibitori di checkpoint (es. nivolumab, ipilimumab), coloro che non rispondono (non-responder) e coloro in cui la malattia progredisce piu’ velocemente in risposta al trattamento (hyperprogressors). Lo scopo è di identificare le basi molecolari che stabiliscono la qualità della risposta clinica dei tre gruppi di pazienti, in seguito a trattamento con immunoterapia, mirandi quindi a migliorare la qualità dei trattamenti con terapie personalizzate. Purificheremo quindi da questi campioni biologici, gli acidi nucleici e le proteine nucleari per le analisi epigenetiche programmate.

-Al fine di sviluppare nuovi inibitori efficaci di RORC1, abbiamo generato tramite sintesi chimica una serie di analoghi di inibitori farmacologici di RORC1. Attualmente stiamo testando la loro efficacia farmacologica utilizzando test cellulari in vitro. Lo studio porterà verosimilmente a selezionare nuovi inibitori di RORC1 che valuteremo in modelli preclinici di tumore, da soli e in associazione con approcci immunoterapici attualmente utilizzati in clinica (es. anti-checkpoint: Nivolumab, Ipilimumab), in pazienti con stadi avanzati del cancro del polmone e melanoma.

Nel prossimo futuro, lo studio proseguirà con l’analisi bioinformatica dei dati di sequenziamento e caratterizzazione (genetica ed epigenetica) delle cellule mieloidi soppressorie,

**Lo studio è stato possibile anche grazie all'aiuto dell'Associazione Augusto per la Vita**