

## La risposta primaria alle neoplasie

---

### “cancer immunosurveillance” e “cancer immunoediting”

---

Il sistema immunitario agisce nelle fasi iniziali dello sviluppo neoplastico con un ruolo protettivo

Burnet F. M.  
The concept of immunologic surveillance.  
*Prog. Exp. Tumor Res.*, **13**: 1-27, 1970

Il sistema immunitario agisce in tutte le fasi della crescita e progressione neoplastica e esercita non solo un ruolo protettivo, ma anche anche un ruolo di modificazione del profilo immunogenico della neoplasia.

Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting.  
*Immunity* **21**, 137–148 (2004).

Queste due teorie non sono in conflitto, la seconda è l'evoluzione della prima

## da “cancer immunosurveillance” a “cancer immunoediting”

In this study, we show that the immune response is essential to prevent the development of carcinogen-induced sarcomas and spontaneous epithelial tumours. We also show that the tumour-suppressor function of the immune system is critically dependent on the actions of IFN $\gamma$ , which, at least in part, are directed at regulating tumour-cell immunogenicity. These studies thus provide experimental evidence that, in principle, supports the original concept of cancer immunosurveillance. However, as tumours that develop in the presence of an intact immune system are less immunogenic than those that develop in immunodeficient hosts, the actions of the immune system also paradoxically favour the eventual outgrowth of tumours that are more capable of escaping immune detection. Thus, tumours are imprinted by the immunologic environment in which they form. For this reason, ‘cancer immunosurveillance’ is not the best term to describe the process because the concept, in its original form, implied that the immune system is involved only at the initial stages of cellular transformation and plays a purely protective role<sup>1,2</sup>. Rather, we favour the use of the term ‘cancer immunoediting’ to describe better the protective and sculpting actions of the immune response on developing tumours that probably occur continuously during tumour development. We

## Cancer immunoediting

ovvero: come la risposta immune modifica il profilo antigenico delle neoplasie durante la progressione tumorale e favorisce l'emergenza di tumori meno immunogenici rispetto alle fasi iniziali di crescita neoplastica

Tre fasi:

1. ELIMINATION: il sistema immune elimina cellule neoplastiche immunogeniche nella fase iniziale di sviluppo delle neoplasie.
2. EQUILIBRIUM: l'instabilità genetica delle neoplasie favorisce lo sviluppo di varianti (all'interno della stessa popolazione neoplastica) con capacità di immunoevasione. Si forma una popolazione eterogenea.
3. ESCAPE: il sistema immune opera un'azione di "editing" della popolazione neoplastica eterogenea e seleziona varianti meno immunogeniche capaci di manifestazione clinica nell'ospite immunocompetente.

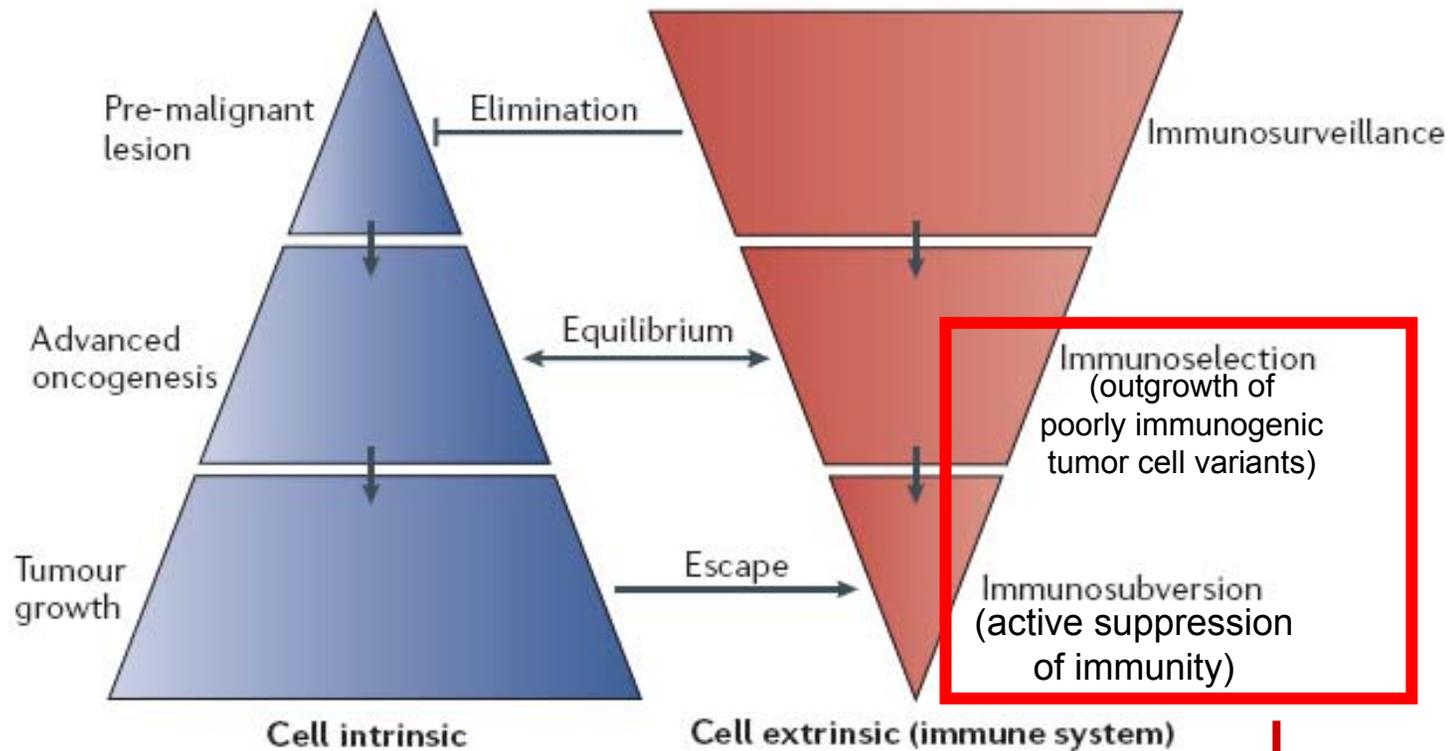


Figure 1 | **Relationship between cell-intrinsic and cell-extrinsic aspects of tumour progression.** This figure illustrates the central concept that multistep carcinogenesis results from crosstalk of cancer-cell-intrinsic factors and host immune system (cell-extrinsic) effects.

### The six hallmarks of cancer.

Cancer cells characteristically 1) provide their own growth signals, 2) ignore growth-inhibitory signals, 3) avoid cell death, 4) replicate without limits, 5) sustain angiogenesis, and 6) invade tissues through basement membranes and capillary walls. *Hanahan, D. & Weinberg, R. A., 2000*

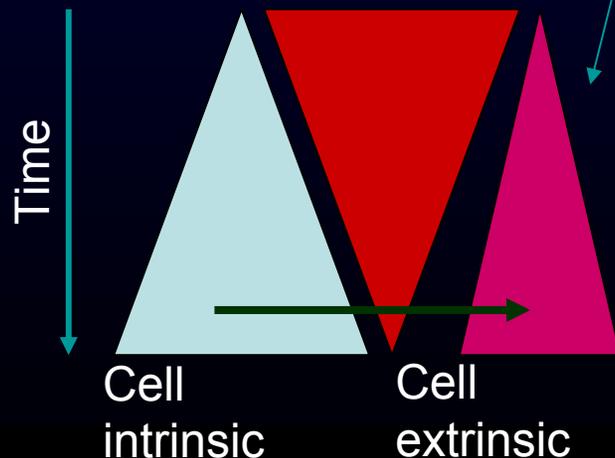
The seventh  
hallmark of cancer

## Da “Cancer immunosurveillance” a “Cancer immunoediting” (Ma probabilmente non è tutto qui)

---

“...However, if the immune system is expected to play a role in controlling tumor growth, then immunity to tumor antigens should evolve as a function of tumor progression, possibly despite concurrent development of tumor escape mechanisms. This model would be in agreement with the dynamic concept of “cancer immunoediting” (5) that predicts a continuous influence of the immune response during tumor development, and not only in the initial stages of neoplastic transformation, as in the original cancer immunosurveillance theory (6).

This progression-related activation of immunity has not yet been demonstrated to occur in human tumors.... “



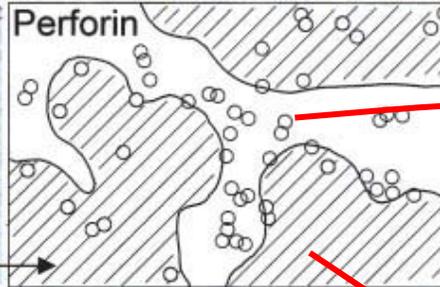
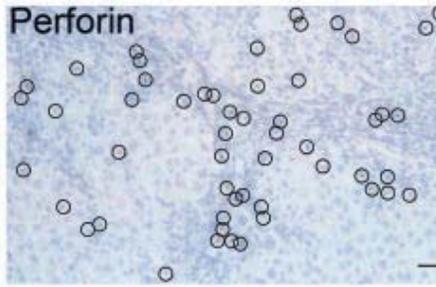
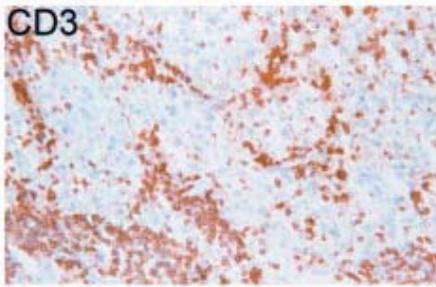
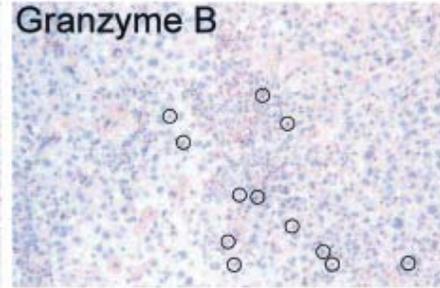
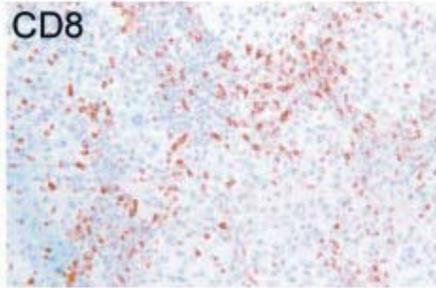
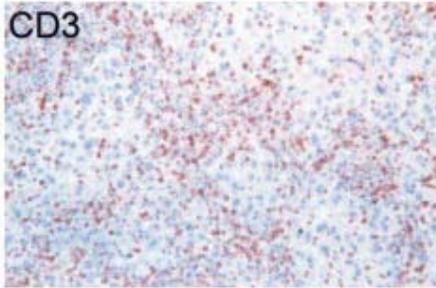
CR 63-2535



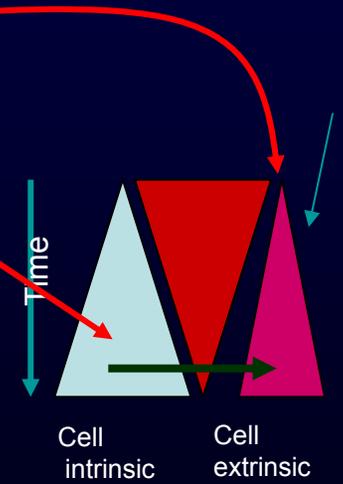
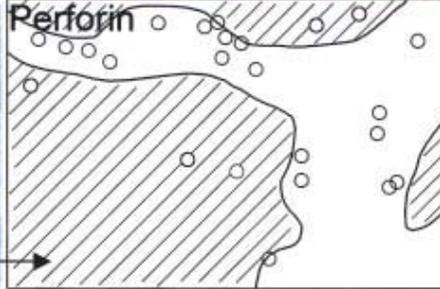
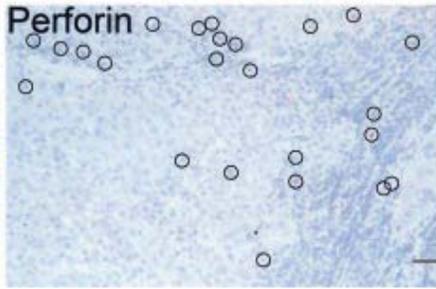
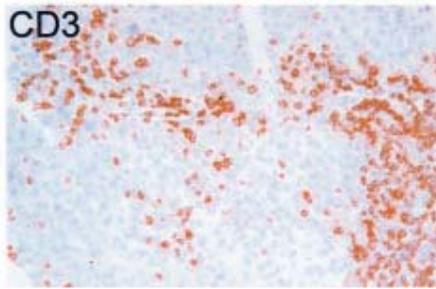
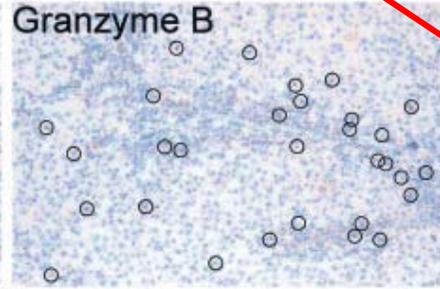
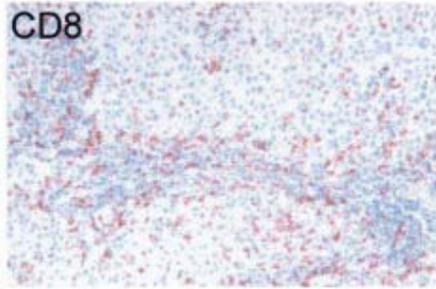
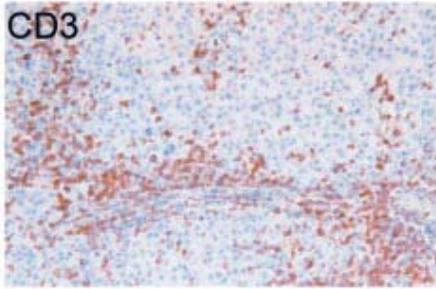
# Defective maturation of T cells at tumor site

**A**

Patient # 4



Patient # 3



## La risposta primaria anti-tumore (natural anti-tumor response)

---

-Molte informazioni sui meccanismi dell'immunità anti-tumore sono state ottenute studiando la risposta "memory" in animali vaccinati. (es CD4+ help for CD8+ T cells).

-Tuttavia, quali sono i meccanismi della risposta primaria anti-tumore?

-In altre parole, come funzione la "cancer immunosurveillance" (Burnett 1970), cioè il riconoscimento e la distruzione delle cellule trasformate nelle fasi iniziali della comparsa dei tumori spontanei?

-Molte risposte alla precedente domanda sono state ottenute negli ultimi anni utilizzando "gene-targeted mice" e saggiandone la suscettibilità a diversi schemi o condizioni di cancerogenesi o allo sviluppo di tumori spontanei.

-In pratica si producono topi nei quali uno o più geni, che potrebbero essere rilevanti per la risposta anti-tumore, vengono inattivati. Successivamente si studia la suscettibilità allo sviluppo di tumori spontanei nell'arco della vita di tali animali in paragone a topi wt, o la suscettibilità a schemi di cancerogenesi.

## Alcune cellule e molecole coinvolte nella cancer immunosurveillance come identificate con esperimenti in gene targeted mice

---

- Linfociti T con recettore  $\gamma\delta$ , che esprimono NKG2D e riconoscono MICA-MICB.
- Linfociti T (sia CD4+ che CD8+) e B.
- Cellule NK e NKT.
- IFN- $\gamma$  .
- IFN- $\alpha/\beta$ .
- Perforina.
- TRAIL.



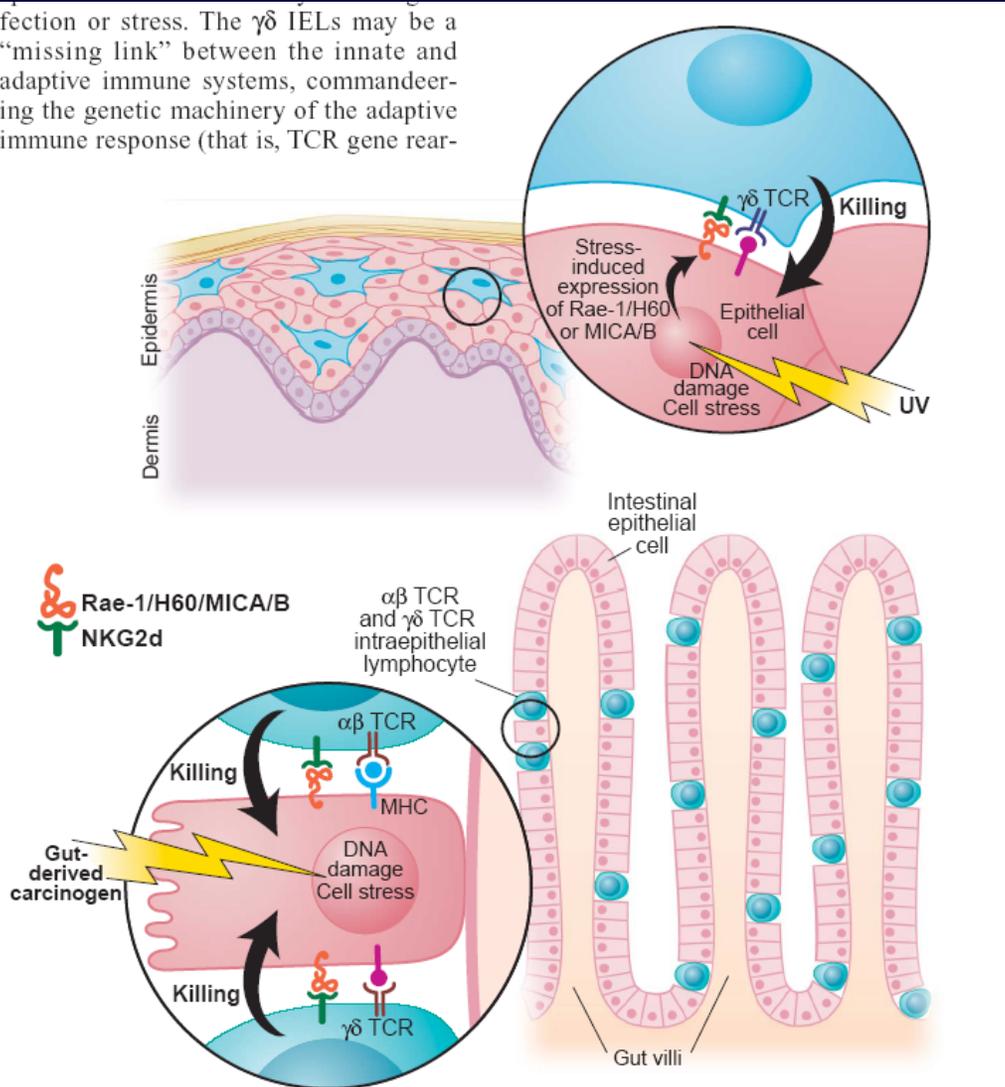
quindi componenti diverse sia dell'immunità innata che di quella adattativa contribuiscono al funzionamento del sistema immune come un "tumor suppressor estrinseco" nella prevenzione dello sviluppo di neoplasie indotte o spontanee.

# Cellule e molecole coinvolte nel “natural anti-tumor response”.

## 1. ruolo di linfociti con TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ che esprimono NK receptors (NKG2D) e riconoscono MICA e MICB su cellule neoplastiche

Topi privi di linfociti T con recettore di tipo  $\gamma\delta$  sono altamente suscettibili a diversi schemi di cancerogenesi cutanea (fibrosarcomi e carcinomi). **Science 294-605**

fection or stress. The  $\gamma\delta$  IELs may be a “missing link” between the innate and adaptive immune systems, commandeering the genetic machinery of the adaptive immune response (that is, TCR gene rear-



Immune surveillance by intraepithelial lymphocytes (IELs) activated by the NKG2d ligands Rae-1 and H60. Two epithelial compartments, skin (top) and intestine (bottom), are prime targets for pathogen invasion and for tumor formation in response to genotoxic stresses such as UV light (skin) or gut-derived carcinogens (gut epithelium). These and other stress stimuli induce expression of the NKG2d ligands Rae-1 and H60 in mice, and MICA and MICB in humans.

(**Top**) Skin IELs expressing the  $\gamma\delta$  TCR are activated by a combination of ligands that engage NKG2d and the  $\gamma\delta$  TCR (ligand not yet identified). Activated  $\gamma\delta$  IELs kill cells that express Rae-1, H60, or MICA/B before they become established as tumors. (**Bottom**) In addition to the  $\gamma\delta$  IELs that recognize the Rae-1, H60, or MICA/B expressed by stressed gut epithelial cells,  $\alpha\beta$  IELs may recognize peptide–MHC class I complexes on stressed intestinal epithelium.

Cellule e molecole coinvolte nel “natural anti-tumor response”.

## 2. ruolo di IFN- $\gamma$ (produzione endogena di IFN- $\gamma$ e capacità di rispondere a IFN- $\gamma$ )

---

L'IFN- $\gamma$  è alla base del sistema di sorveglianza immune che controlla lo sviluppo di tumori indotti tramite cancerogenesi chimica o che si sviluppano naturalmente.

-Maggiore frequenza e comparsa più precoce di tumori a seguito di cancerogenesi chimica in topi privi di IFN- $\gamma$ R o di STAT-1.

Il meccanismo dipende dalla capacità di IFN- $\gamma$  di accrescere l'immunogenicità delle cellule trasformate. (**PNAS-95-7556**).

-Topi IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> sviluppano linfomi B disseminati spontanei (**JEM-196-129**).

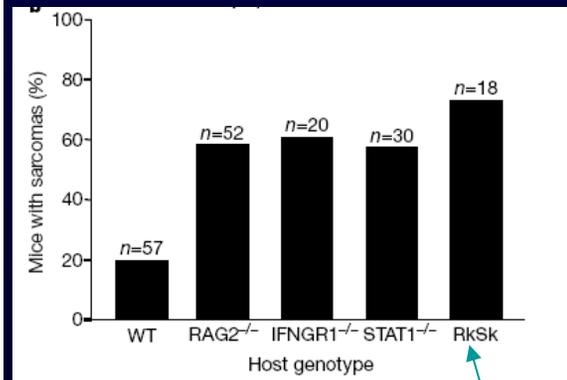
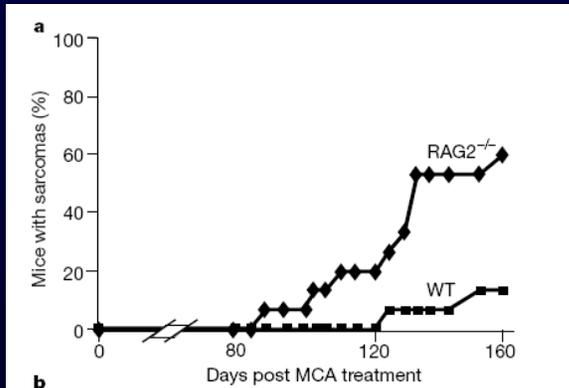
-Linfociti e IFN- $\gamma$  collaborano nella protezione contro lo sviluppo di sarcomi indotti da cancerogeni e di carcinomi spontanei. Il sistema tuttavia seleziona tumori con ridotta immunogenicità, (cancer immunoediting) spiegando la crescita progressiva di neoplasie in ospiti immunocompetenti (**Nature 410-1107**).

# Cellule e molecole coinvolte nel “natural anti-tumor response”.

## 3. ruolo di linfociti

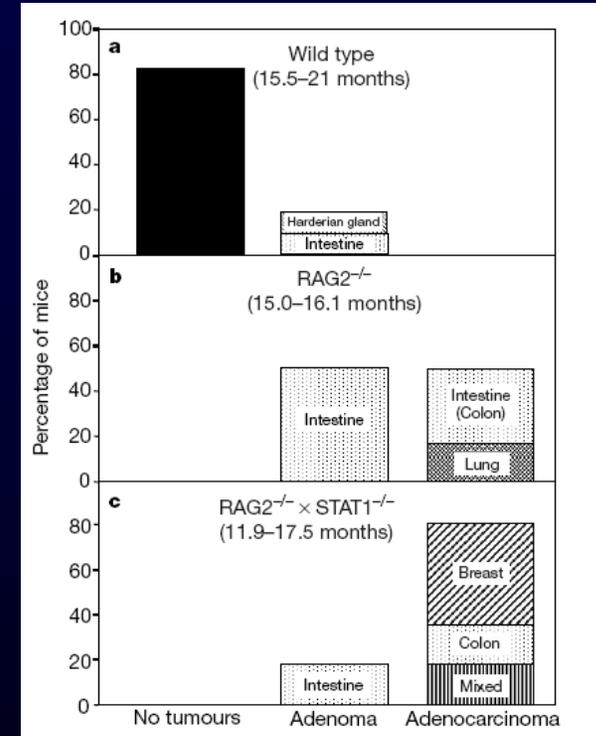
Nature 410-1107 Tumori da MCA e tumori spontanei in RAG2<sup>-/-</sup> mice.  
Aumentano tumori indotti e tumori spontanei

sarcomi



Rag2<sup>-/-</sup>xSTAT-1<sup>-/-</sup>

carcinomi

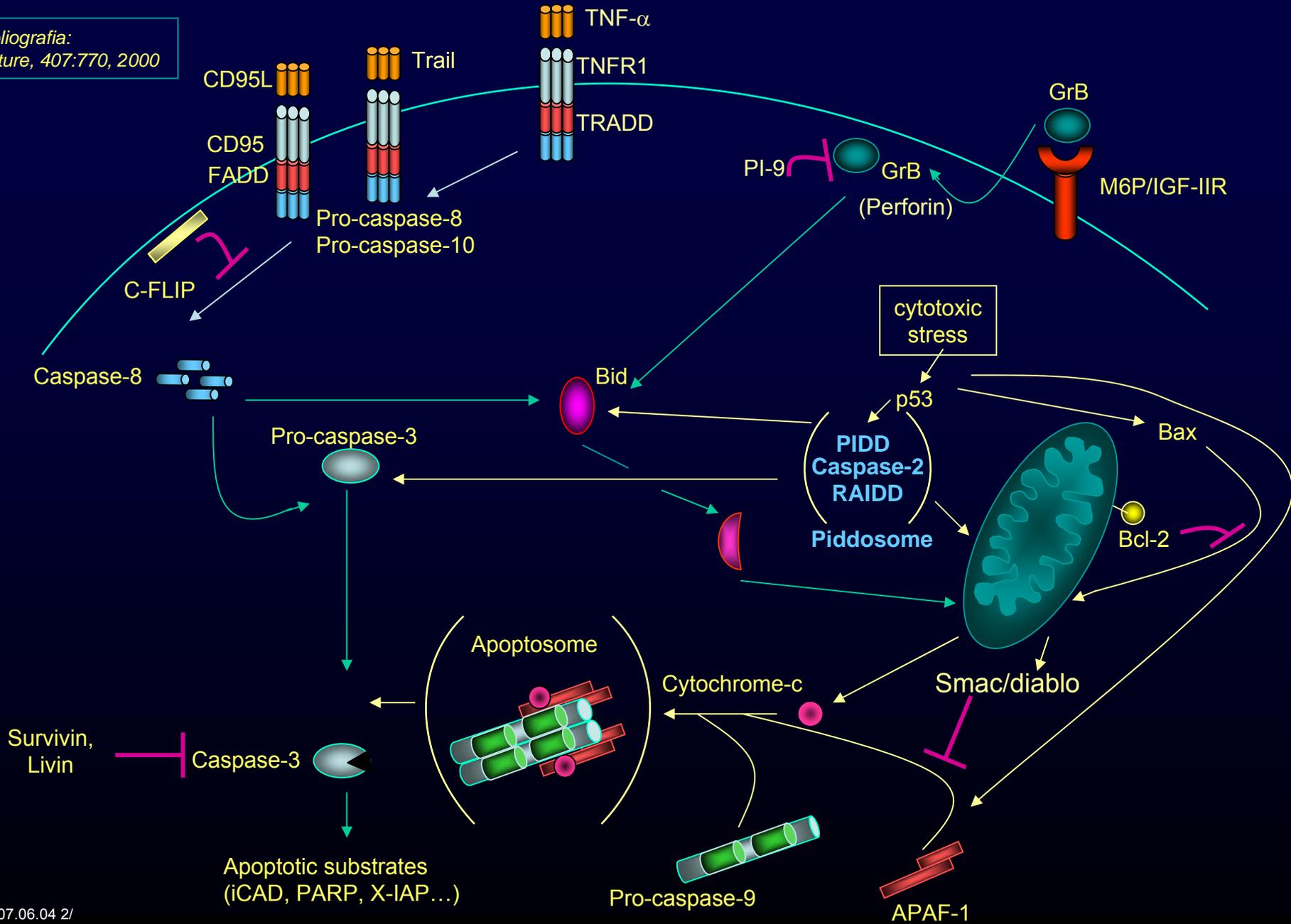


“si fa presto a dire “RAG<sup>-/-</sup>”?

**N.B.** Functional immunoglobulin and T-cell receptor (TCR) genes are assembled from non-contiguous gene segments by a series of site-specific recombination reactions collectively termed V(D)J recombination. Seven different loci containing V, J and sometimes D segments may be joined by this reaction: the TCR  $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ , and immunoglobulin H,  $\kappa$  and  $\lambda$  loci. All rearrangements are mediated by conserved recombination signal sequences (RSSs) that mark the border of the coding segments. Recombination is initiated by two lymphoid-specific proteins, RAG1 and RAG2 that recognize the RSS and introduce a double-strand break at the signal-coding boundary. The rearrangement is then completed by a process that involves a number of double-strand break repair factors.

# Apoptosis by the "intrinsic" and the "extrinsic" pathways

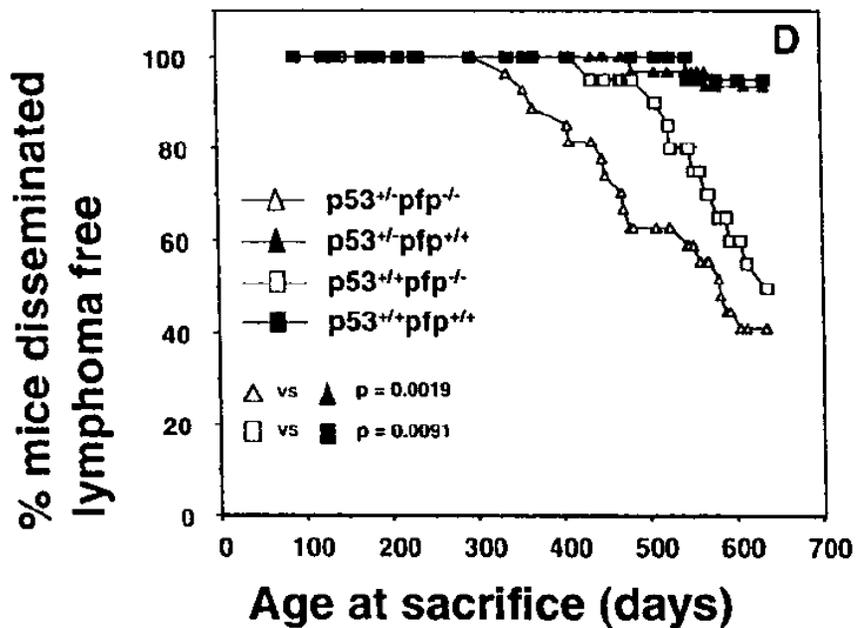
Bibliografia:  
Nature, 407:770, 2000



Cellule e molecole coinvolte nel “natural anti-tumor response”.

#### 4. ruolo di perforina (espressa in T e NK)

-Topi perforin-deficient hanno un aumentato sviluppo di linfomi “late onset” nei diversi lineages T, B e NKT e se i topi sono anche p53-deficient l’incidenza di linfomi aumenta ulteriormente. (JEM-192-755).



solo nei topi?

Blood DOI 10.1182/blood-2004-041477

...We analysed 29 patients and we found that 4 patients, who developed either Hodgkin or non-Hodgkin lymphoma, had bi-allelic mutations of the perforin gene.

“.. In 2 out of the 4 patients with bi-allelic mutations of the perforin gene, we evaluated perforin expression by flow-cytometry and natural killer (NK) activity, and both were found to be absent. Moreover, we documented the presence of mono-allelic mutations of the perforin gene in 4 more patients”.

“...These findings suggest that perforin plays a key role also in the mechanisms of immune-surveillance that prevent tumor growth and/or development”

Cellule e molecole coinvolte nel “natural anti-tumor response”.

## 5. ruolo di cellule NK e NKT e IL-12

NK1.1<sup>+</sup> T (NKT)<sup>1</sup> cells are defined as specialized populations of  $\alpha/\beta$  T cells that coexpress some receptors of the NK cell lineage (5). NKT cells consist mainly of CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> double negative and CD4<sup>+</sup> cells (6, 7), most of which express a restricted TCR repertoire comprising an invariant V $\alpha$ 14J $\alpha$ 281 TCR  $\alpha$  chain (8) associated with polyclonal V $\beta$ 8, V $\beta$ 7, and V $\beta$ 2 TCR  $\beta$  chains. A TCR J $\alpha$ 281 gene-

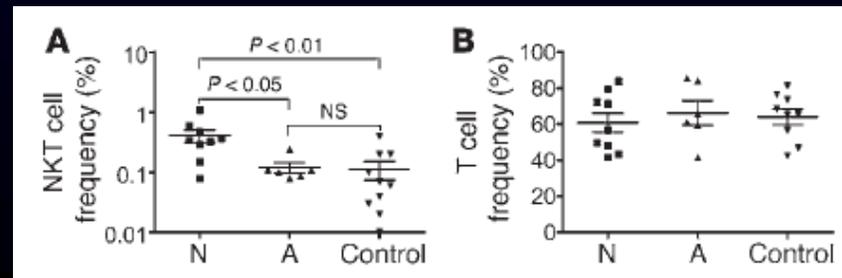
NB.

V $\alpha$ 24<sup>+</sup> NKT in humans recognize self and microbial-derived glycolipids in the context of MHC-like CD1d

-Cellule NKT proteggono topi dallo sviluppo di fibrosarcomi indotti da metilcolantrene. IL-12 è necessaria per l'attività delle cellule NKT. (JEM 191-661).

-Pazienti con neuroblastoma, nel 25% dei casi hanno amplificazione di MYCN. Questi pazienti hanno meno NKT nel bone marrow invaso da tumore.

-MYCN sopprime la produzione di CCL2 necessario per il reclutamento di NKT. JCI 117-2702.

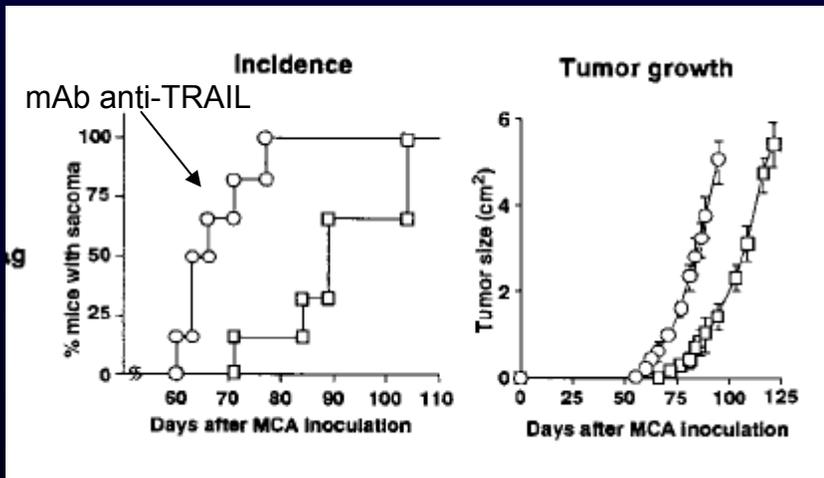


Cellule e molecole coinvolte nel “natural anti-tumor response”.

## 6. ruolo di TRAIL

-TRAIL (prodotto da cellule NK) ha un ruolo di molecola effettrice nella sorveglianza immune mediata da NK e dipendente da IFN- $\gamma$ .

-La neutralizzazione di TRAIL in-vivo potenzia lo sviluppo di tumori da cancerogenesi chimica in topi wt e aumenta l'incidenza di tumori spontanei in topi p53-deficient. (JEM-195-161)



## E nell'uomo?

---

-Immunosuppressed transplant recipients have an increased risk of developing certain cancers, including cancers without a known viral aetiology, such as melanoma. However, such patients have no increased risk of developing gastrointestinal, urogenital or respiratory cancers.

-Patients with Chediak–Higashi syndrome, an autosomal recessive disorder that is characterized by abnormal cytotoxic function of NK cells, have a 200-fold higher risk of developing malignancy than do individuals who do not suffer from this syndrome.

-Biallelic mutations of the gene that encodes perforin might predispose patients to the development of Hodgkin's lymphoma or non-Hodgkin's lymphoma.

-a polymorphism in CD95 ligand (CD95L; also known as FASL) predisposes patients to increased activation-induced cell death of T cells and to cervical cancer.

-Carrying specific combinations of HLA alleles and alleles that encode the cognate killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIRs), which are expressed by NK cells, also results in a predisposition to cervical cancer.

-The presence of certain human *NKG2D* alleles, which affect the natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes, is associated with a risk of developing cancer at any site.

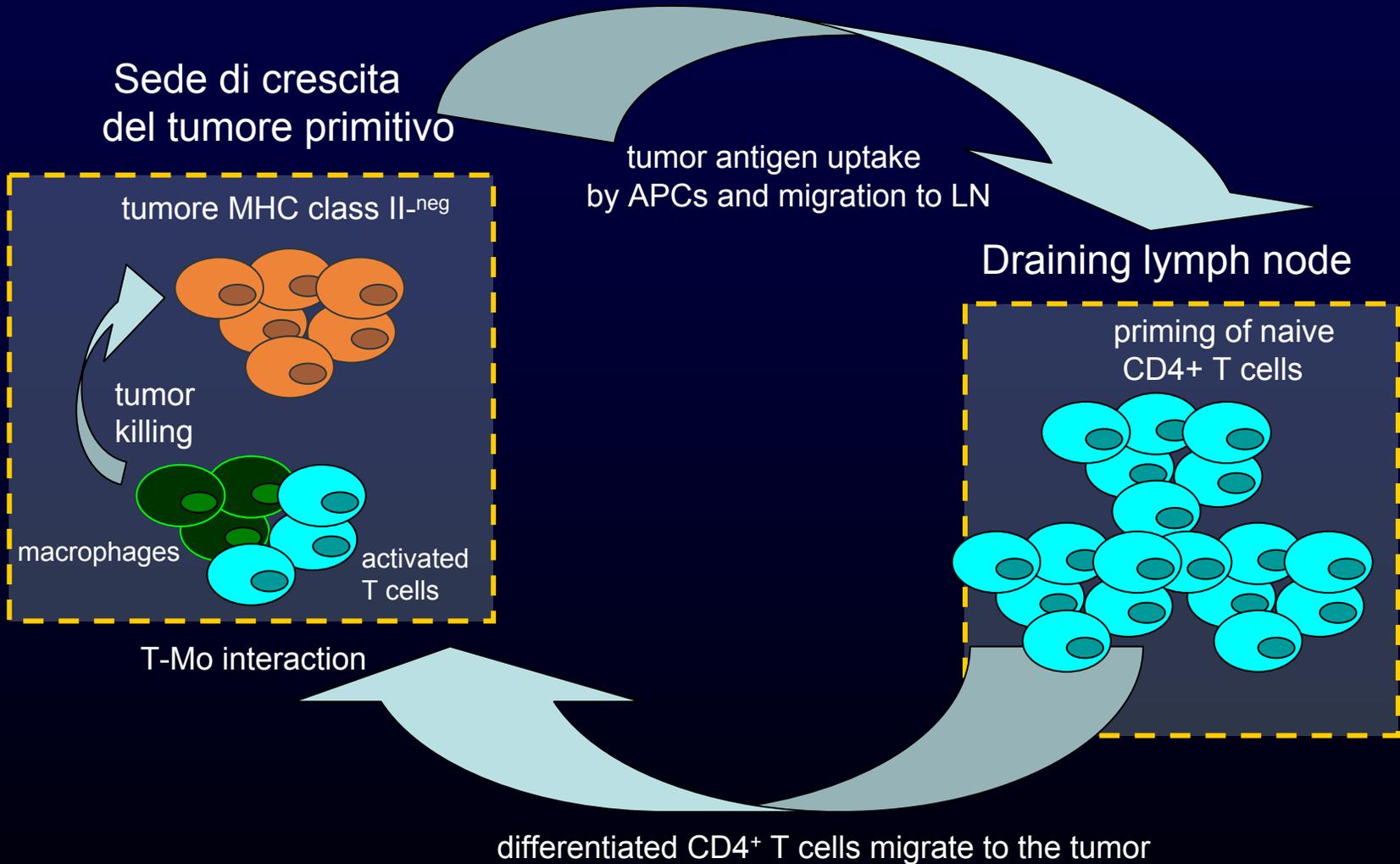
Così come l'immunoediting, anche il meccanismo della risposta primaria alle neoplasie richiede la collaborazione tra diverse componenti del sistema immune.

## Primary Antitumor Immune Response Mediated by CD4<sup>+</sup> T Cells

Gene-targeted mice have recently revealed a role for lymphocytes and interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) in conferring protection against cancer, but the mechanisms remain unclear. Here, we have characterized a successful primary antitumor immune response initiated by

naive CD4<sup>+</sup> T cells. Major histocompatibility complex class II (MHC-II)-negative myeloma cells injected subcutaneously into syngeneic mice were surrounded within 3 days by macrophages that captured tumor antigens. Within 6 days, naive myeloma-specific CD4<sup>+</sup> T cells became activated in draining lymph nodes and subsequently migrated to the incipient tumor site. Upon recognition of tumor-derived antigenic peptides presented on MHC-II by macrophages, the myeloma-specific CD4<sup>+</sup> T cells were reactivated and started to secrete cytokines. T cell-derived IFN $\gamma$  activated macrophages in close proximity to the tumor cells. Tumor cell growth was completely inhibited by such locally activated macrophages. These data indicate a mechanism for immunosurveillance of MHC-II-negative cancer cells by tumor-specific CD4<sup>+</sup> T cells through collaboration with macrophages.

# Risposta anti-tumore primaria mediata da cellule T CD4<sup>+</sup> in collaborazione con macrofagi

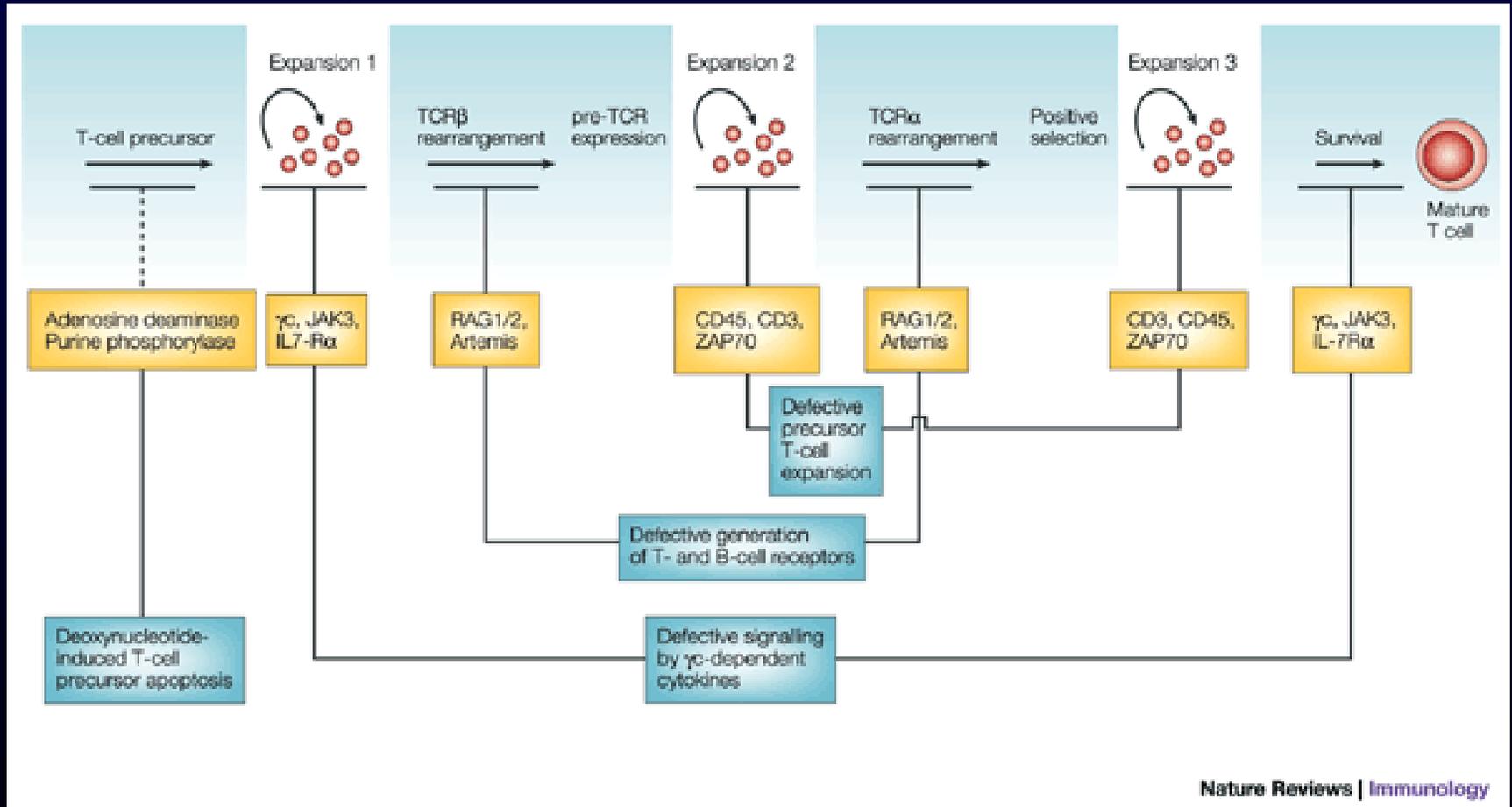


## Sistema sperimentale

- Topi transgenici per TCR Id-specifico (peptide della regione variabile della catena leggera del mieloma MOPC315). Il peptide è visto dal TCR transgenico nel contesto della molecola MHC-class II I-E<sup>d</sup>.
- Tali topi sono anche stati resi omozigoti per la mutazione SCID che previene il riarrangiamento dei TCR endogeni.
- Questi topi sono resistenti al mieloma MOPC315 a causa dell'alta frequenza di T CD4<sup>+</sup> che esprimono il TCR transgenico, mentre topi wt muoiono dopo inoculo di tale tumore.
- MOPC315 non esprime molecole MHC-class II. Quindi le cellule T CD4<sup>+</sup> specifiche non possono riconoscere direttamente il tumore.
- Il mieloma, per sua natura, non può essere confinato; pertanto viene inoculato dopo inclusione in matrigel, che rimane solido alla temperatura corporea del topo, in modo da consentire di studiare la risposta primaria al tumore nel sito di inoculo s.c.

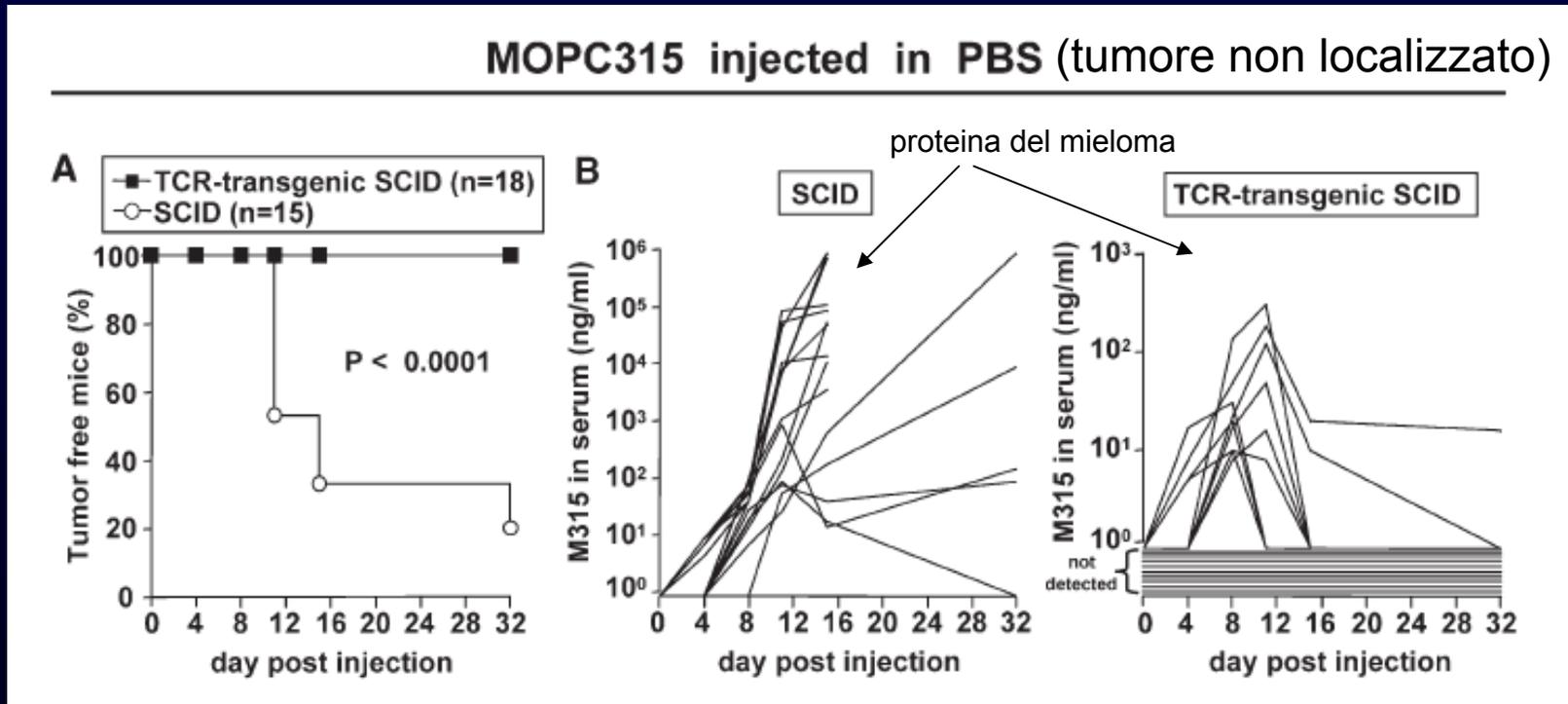
T cells develop in the thymus from T-cell precursors, and pass through distinct developmental stages to become mature T cells — namely,

- V(D)J recombination,
- pre-T-cell receptor (pre-TCR) expression and induced clonal expansion,
- and TCR-triggered positive and negative selection.



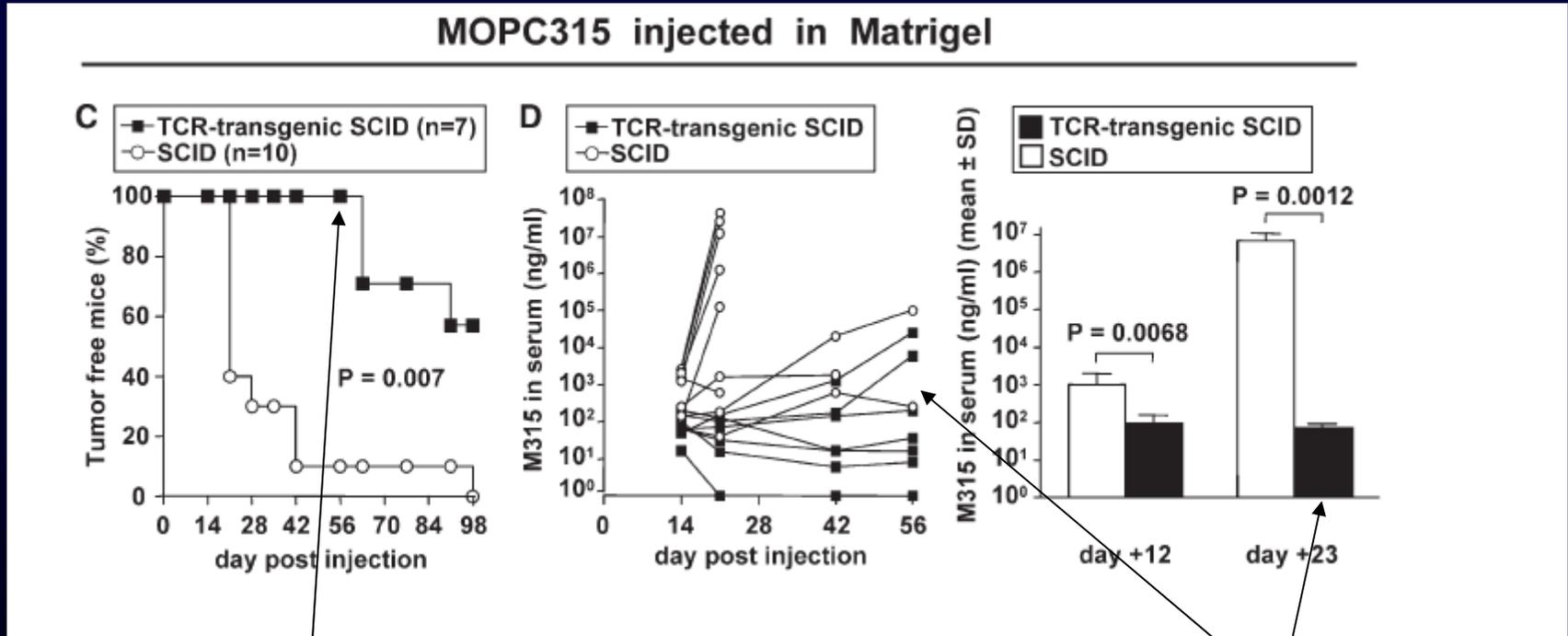
Mutations of the genes that encode the proteins (orange boxes) cause severe combined immunodeficiency (SCID) or profound T-cell deficiency, which can be divided into four groups according to pathophysiology (represented here by the four blue boxes).

I topi TCR-transgenici SCID sono protetti nei confronti della crescita di MOPC315



i meccanismi effettori anti-tumore vengono attivati prima di 11 giorni e la risposta primaria è in pratica completa al giorno 15

# I topi TCR-transgenic SCID sono protetti nei confronti della crescita di MOPC315

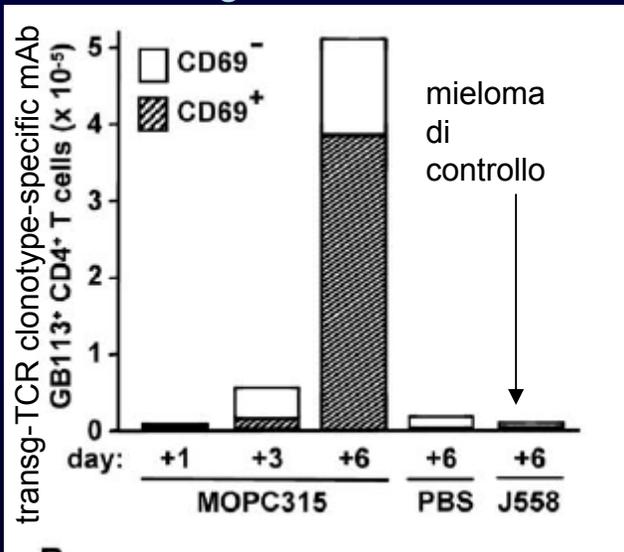


La protezione da crescita di MOPC315 dura circa 50 giorni

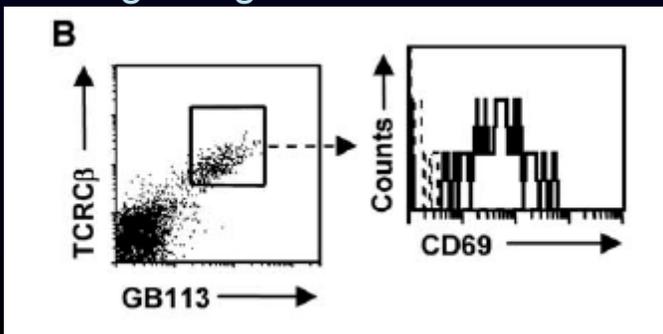
e il rigetto del tumore non è completo

# Espansione, attivazione e migrazione di cellule T CD4+ Id-specifiche dopo inoculo del tumore

Espansione ed attivazione di CD4+ Id-specifiche nel draining LN

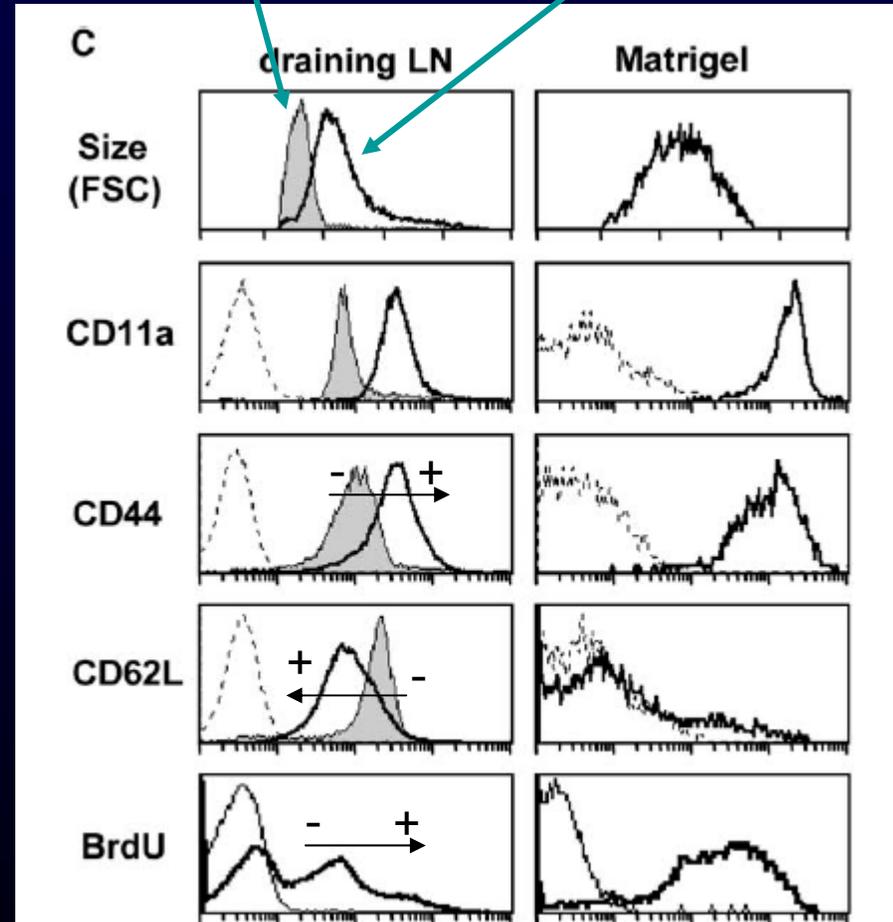


CD4+ Id-specifiche ed attivate migrano nel gel di matrigel al giorno +6



TCR-transgenic mice not injected with tumor      TCR-transgenic mice injected with tumor

day+9

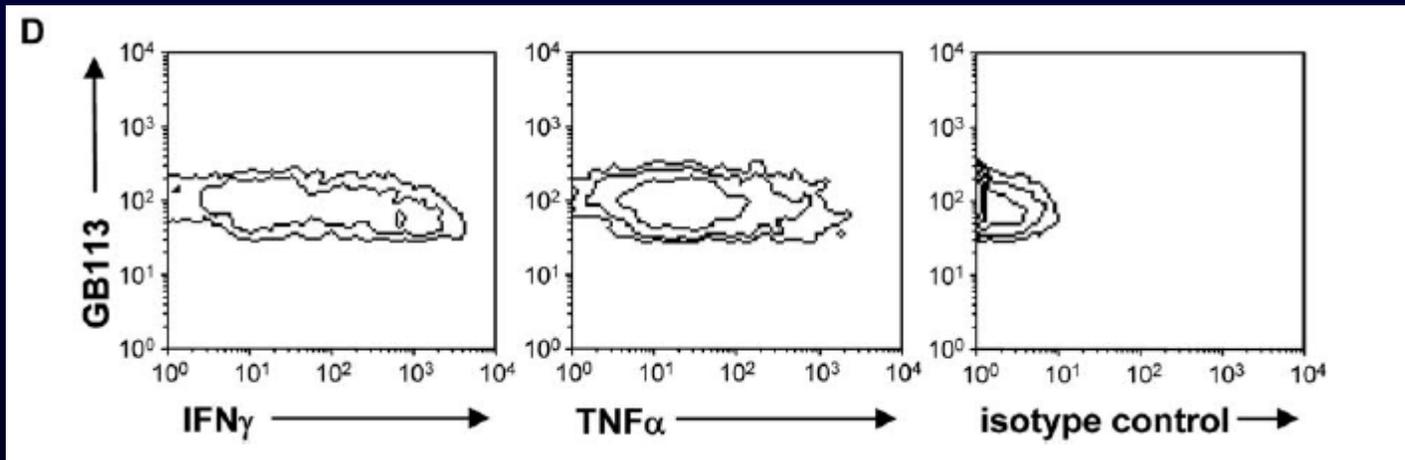


n.b.

CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup> cells possono entrare in organi non linfatici

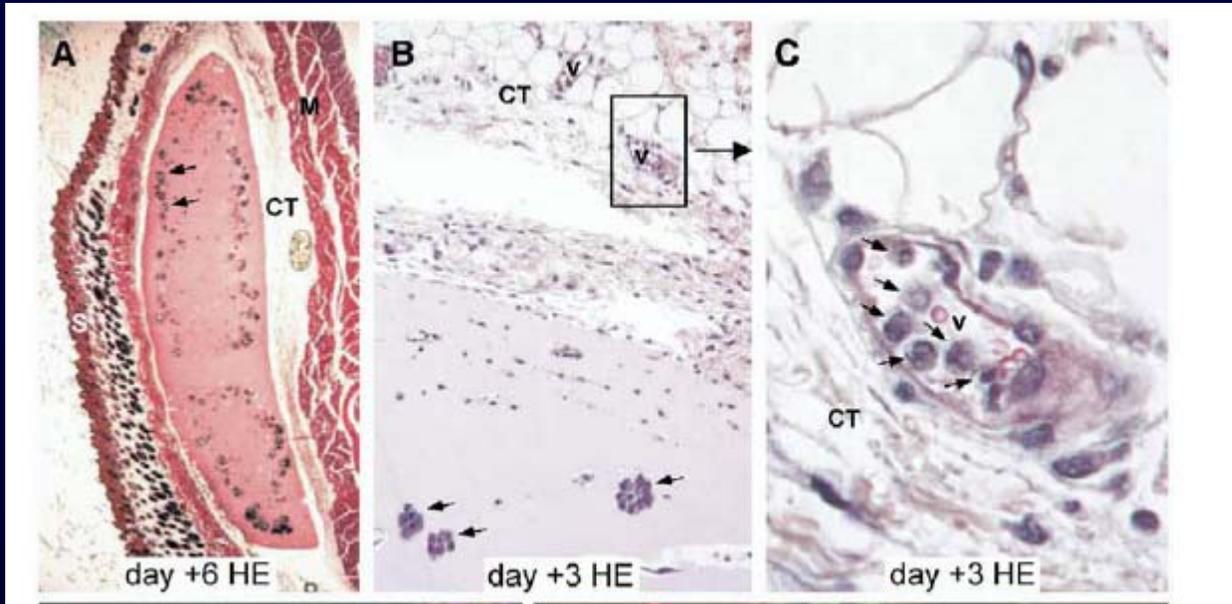
# Espansione, attivazione e migrazione di cellule T CD4+ Id-specifiche dopo inoculo del tumore

Fenotipo funzionale dei CD4+ Id-specifici, isolati dal tumore al giorno +11  
produzione di citochine TH1 dopo PMA+Ionomycin



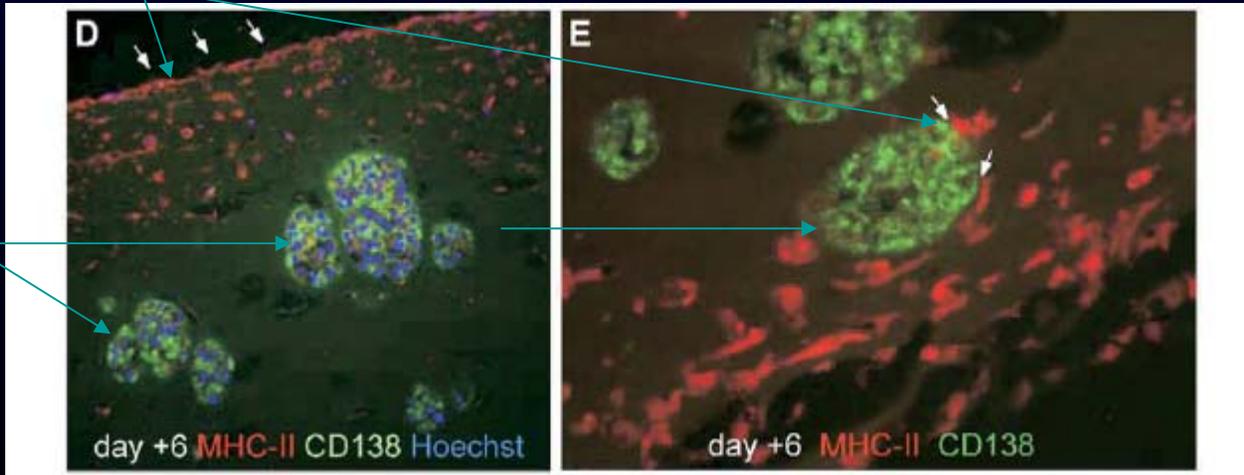
# infiltrato di cellule MHC-II+ nel matrigel

arrows: tumor cells

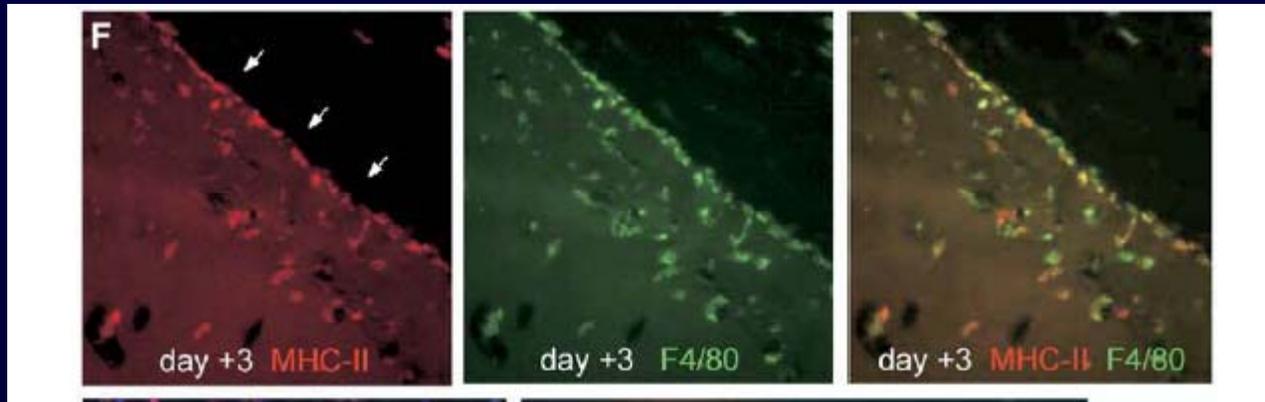


red: MHC-class II+ cells

green:  
tumor cells  
(CD138+)

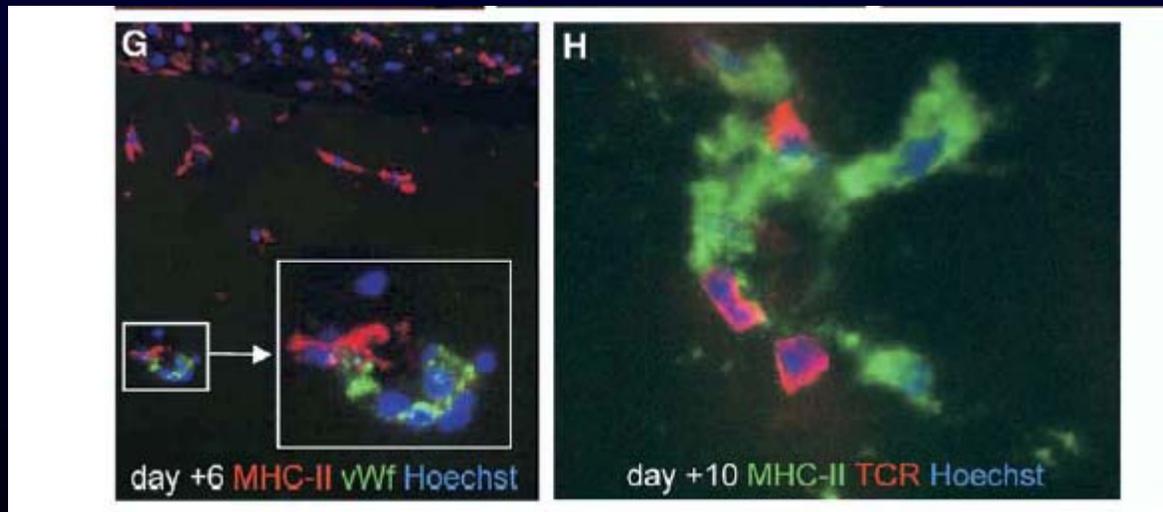


Le cellule MHC-II+ sono macrofagi che penetrano nel matrigel



i macrofagi penetrano nel matrigel  
anche dai vasi

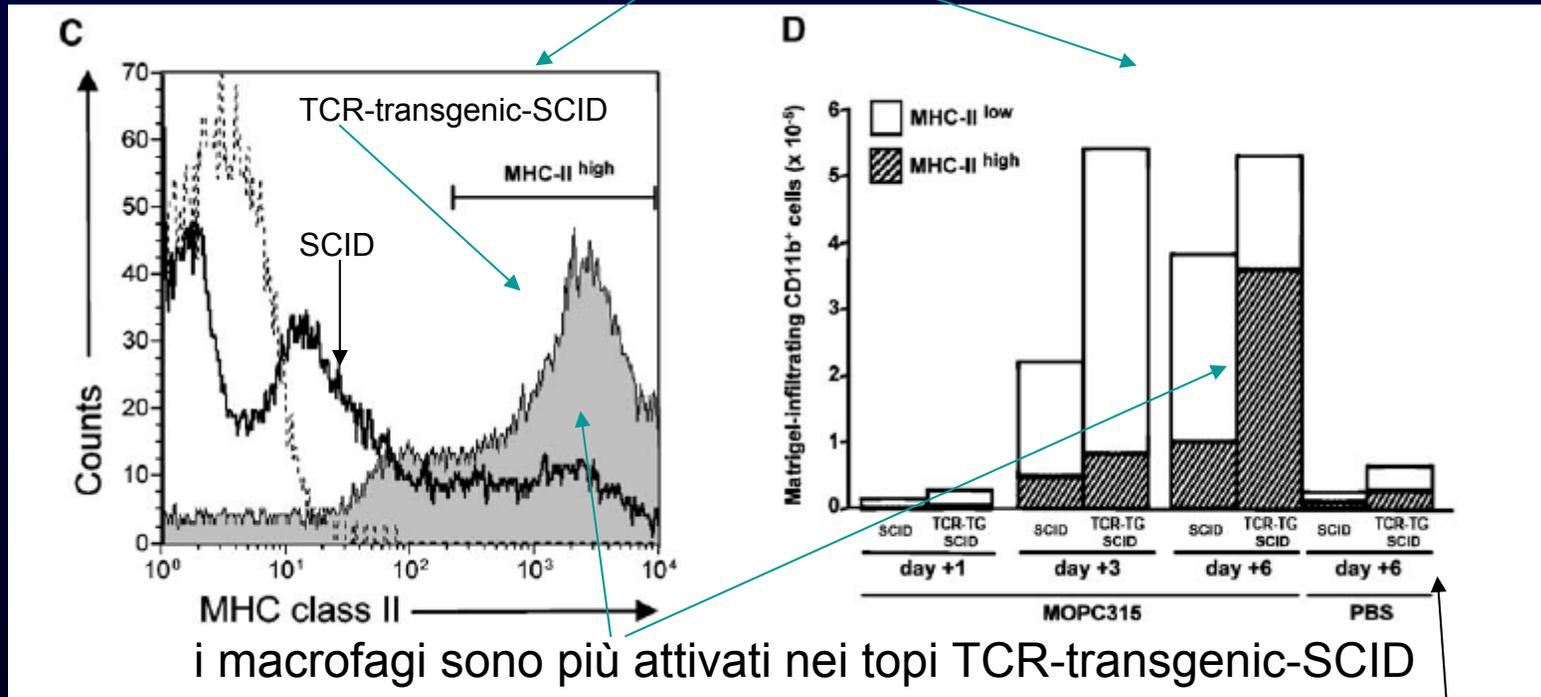
cellule T CD4+ Id-specifiche interagiscono  
con i macrofagi nel matrigel





# il fenotipo dei macrofagi intra-matrigel

espressione di MHC-II in CD11b+ cells  
from tumor-containing matrigel-day+5

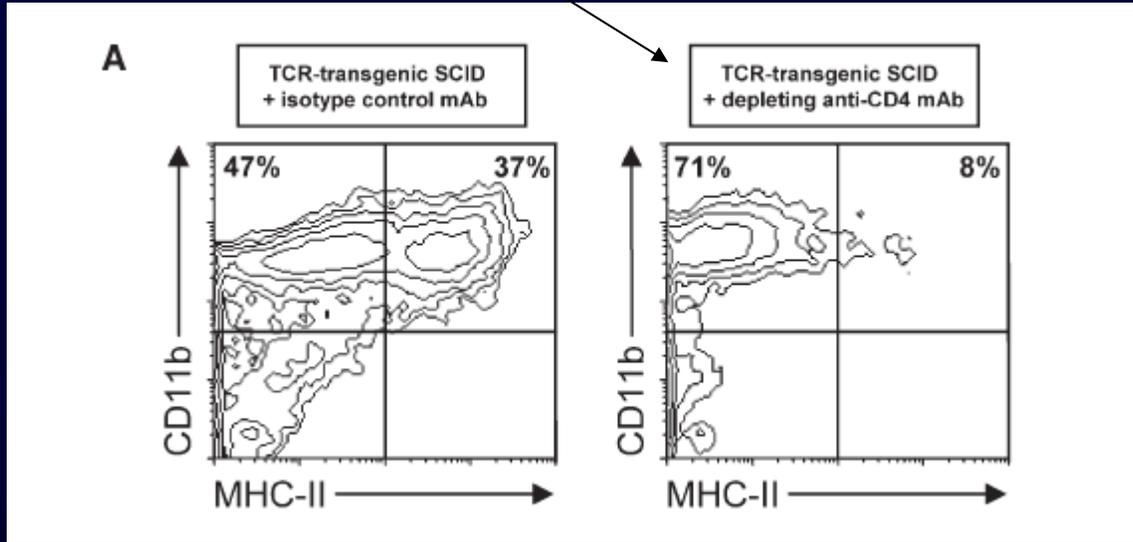


(perchè a 5-6 giorni ci sono già nel matrigel le cellule TCD4+ Id-specifiche che attivano i macrofagi. Ma questo lo si dimostra dopo)

il matrigel di per se non richiama macrofagi, è il tumore che induce il fenomeno

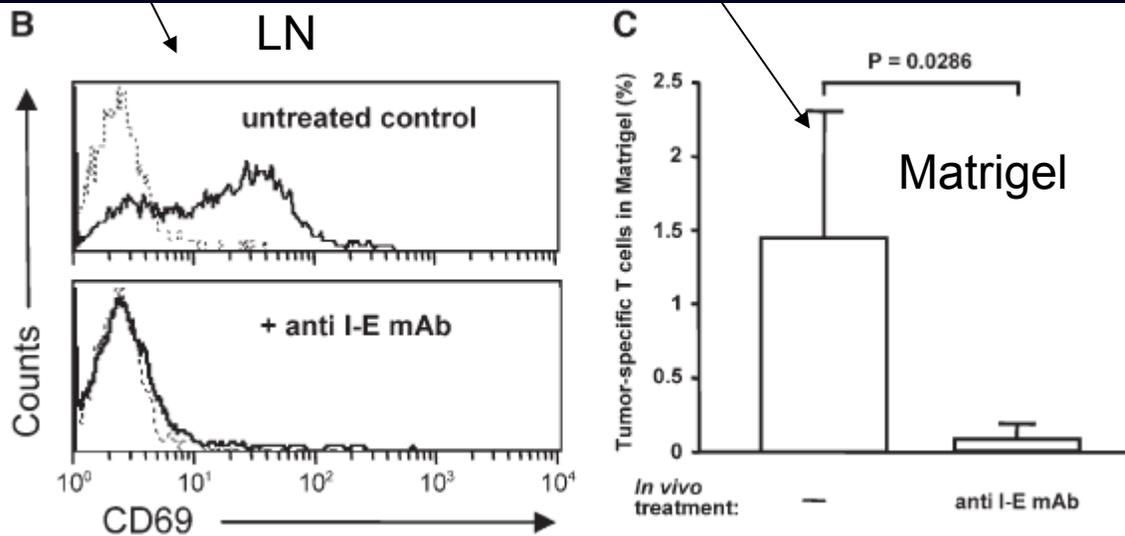
# No CD4+ T cells, No party

il trattamento in vivo i.p. con anti-CD4 (depleting)  
impedisce l'attivazione, non l'ingresso di macrofagi nel matrigel. day+6



qui si blocca l'effetto  
attivante dei CD4+  
sui macrofagi

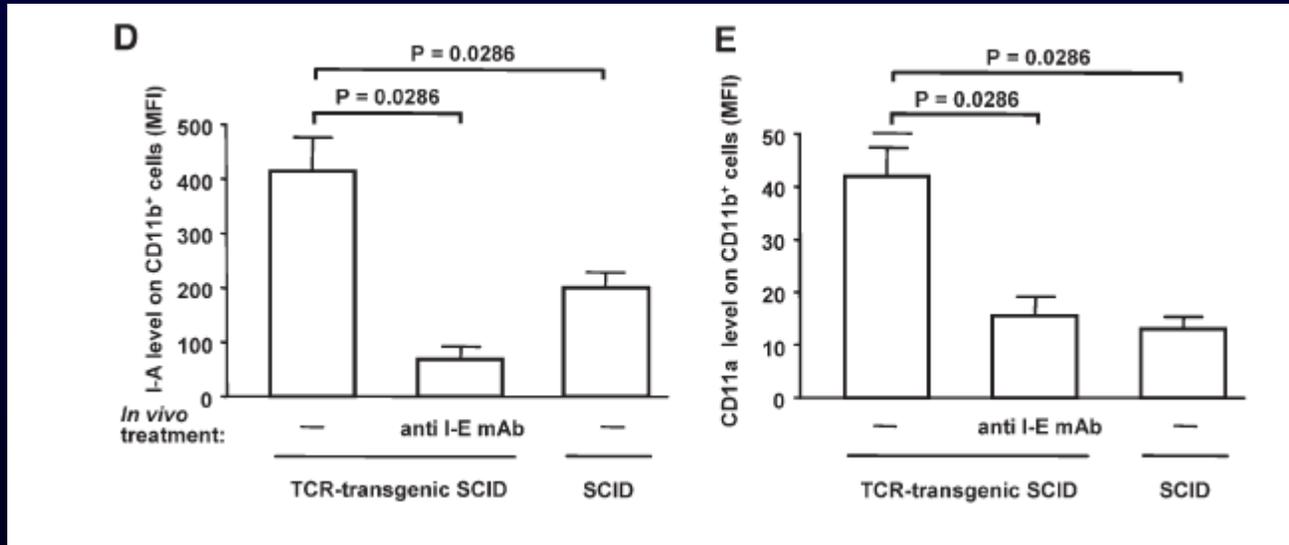
il trattamento in vivo s.c. con anti-MHC-II (blocking)  
impedisce l'attivazione CD4+ nei LN, e l'ingresso di cellule T CD4+ Id-specifiche nel matrigel. day+7



qui in pratica si blocca  
il CD4+ T cell priming  
dipendente da  
presentazione antigenica  
in MHC-II nel LN e si  
blocca anche la successiva  
migrazione nel matrigel  
delle CD4+ "primed"

## Effetto di anticorpi anti MHC class II sul fenotipo di macrofagi recuperati dal matrigel con tumore

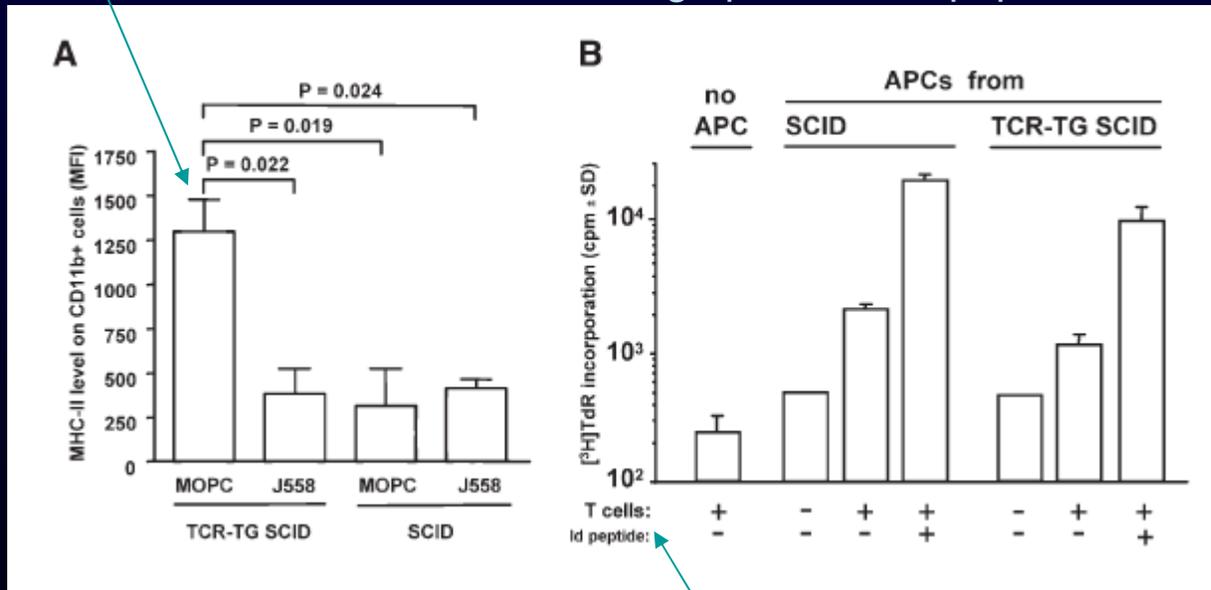
il trattamento con mAb anti-MHC-II (I-E) blocca l'attivazione dei macrofagi, verificata come espressione di MHC-II (I-A) e CD11a, nel matrigel



topi inoculati con matrigel contenente tumori diversi: verifica dello stato di attivazione dei macrofagi recuperati dal matrigel e delle loro capacità di immunostimolazione

attivazione dei macrofagi è antigenica specifica

i macrofagi estratti dal matrigel attivano le cellule T Id-specifiche: ergo presentano peptidi dal tumore

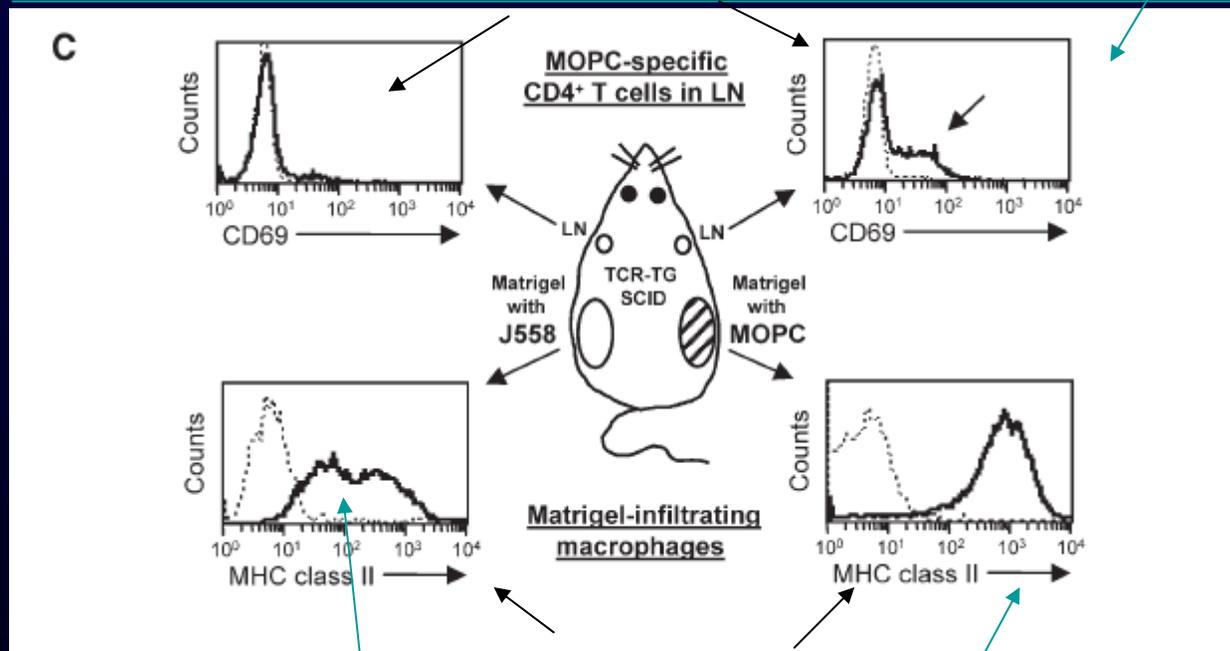


cellule T Id-specifiche

# attivazione T locale e migrazione T sistemica in topi inoculati con matrigel contenente tumori diversi

il T cell priming è solo nel draining LN, non è sistemico

Gated on Id-specific CD4<sup>+</sup> T cells



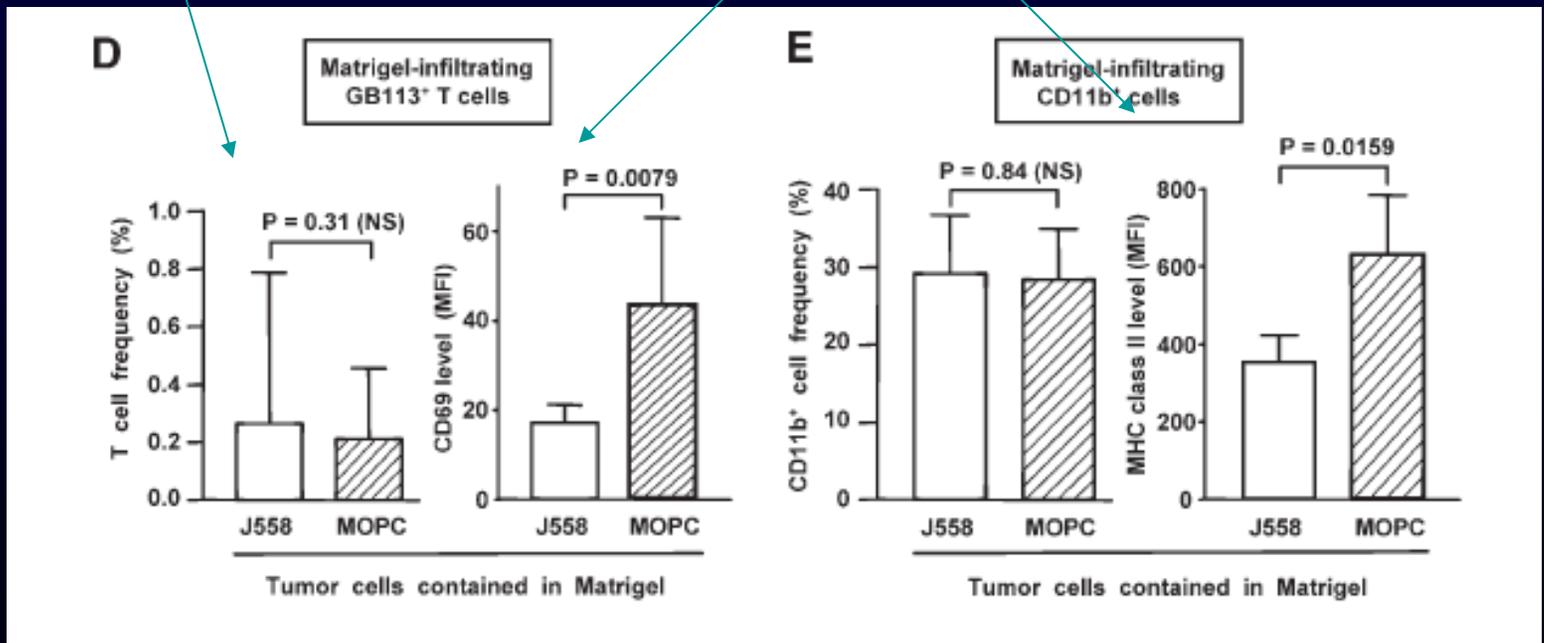
Gated on macrophages

ma se anche i macrofagi a sinistra sono attivati, allora vuole dire che la migrazione T è sistemica, non è antigene-specifica, infatti...

# migrazione T sistemica in topi inoculati con matrigel contenente tumori diversi

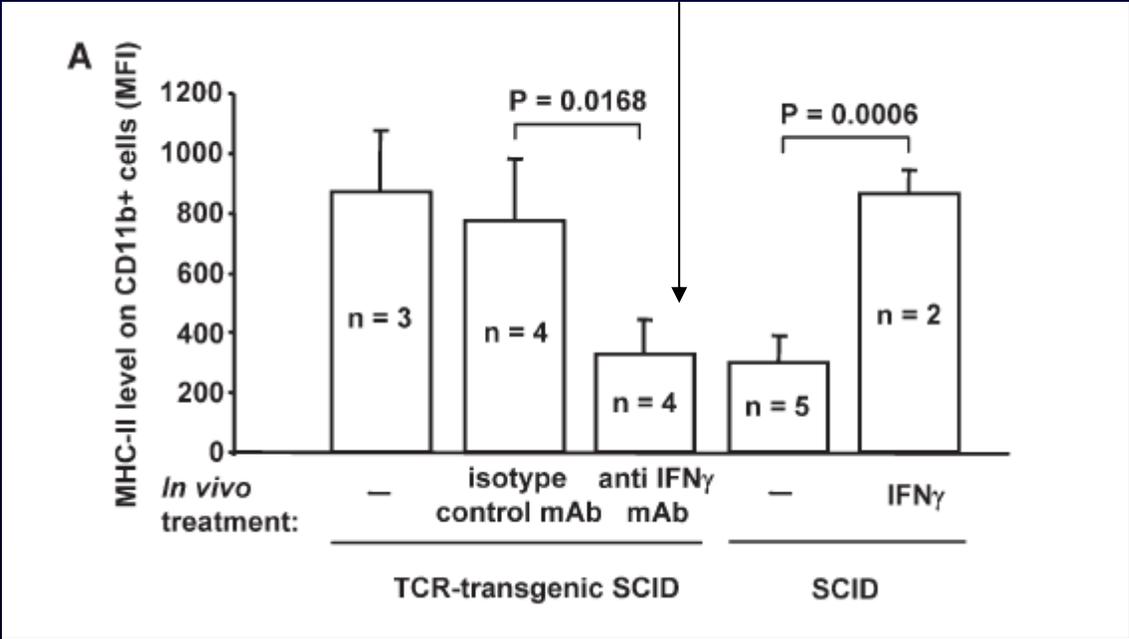
infatti non c'è differenza  
di infiltrato T  
rispetto al tumore di controllo

sebbene attivazione T e attivazione  
dei macrofagi sia antigene specifica nel matrigel



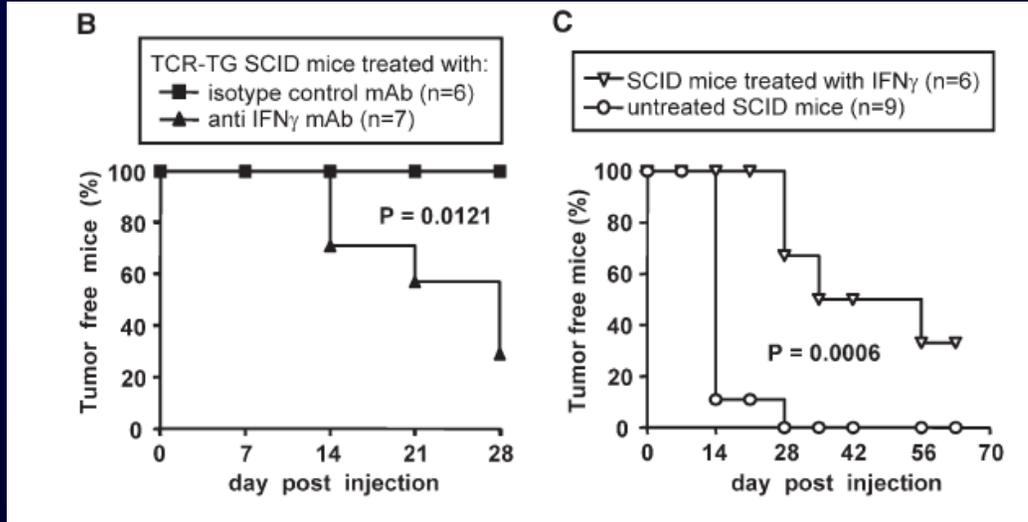
# Qual'è il meccanismo dell'attivazione dei macrofagi nel matrigel da parte delle cellule T?

## Trattamento in-vivo con mAb-anti IFN- $\gamma$ (blocking)



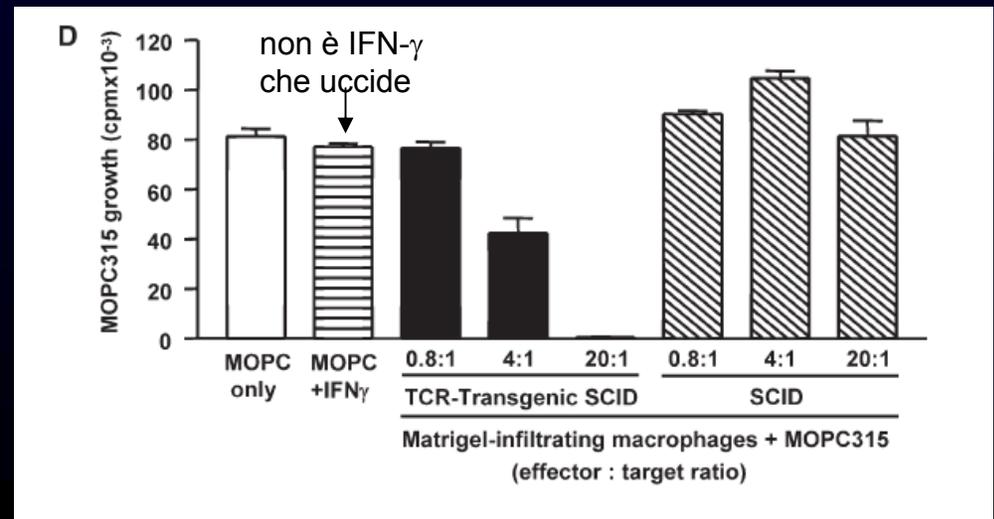
# Ruolo di IFN- $\gamma$ nella risposta protettiva dipendente da CD4+ e mediata da macrofagi

## tumore per via s.c. in PBS



nb: macrophages can kill neoplastic cells by several mechanisms such as Nitric oxide and reactive oxygen intermediates, but IFN- $\gamma$  may also induce anti-angiogenic chemokines in stroma or tumor cells

## tumore per via matrigel



# Risposta anti-tumore primaria mediata da cellule T CD4<sup>+</sup> in collaborazione con macrofagi

