



Presidio Ospedaliero
di Brescia

Sistema Socio Sanitario



Regione
Lombardia

ASST Spedali Civili



Università
degli Studi
di Brescia

U.O. ANATOMIA PATOLOGICA

Direttore: Prof. Fabio Facchetti

Tel: 030-3995378-830 Fax: 030-3995377

Email: anatomia.patologica@asst-spedalivicili.it

TITOLO: CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA E MOLECOLARE DEL CARCINOMA A CELLULE TRANSIZIONALI DELLA VESCICA

Responsabile Scientifico (PI):

PROF. WILLIAM VERMI

Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale, UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BRESCIA

U.O. ANATOMIA PATOLOGICA, ASST DEGLI SPEDALI CIVILI DI BRESCIA

Collaboratori:

DR LUISA BENERINI GATTA

Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale, UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BRESCIA

U.O. ANATOMIA PATOLOGICA, ASST DEGLI SPEDALI CIVILI DI BRESCIA

PROF. CLAUDIO SIMEONE /DR. LUCA CRISTINELLI-

Dipartimento di Specialità medico-chirurgiche, scienze radiologiche e sanità pubblica, UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI

BRESCIA- U.O. DI UROLOGIA, ASST-SPEDALI CIVILI DI BRESCIA

DR. CATHY TOURNIER/ DR. EMANUELE GIURISATO

Faculty of Biology, Medicine and Health, UNIVERSITY OF MANCHESTER, Manchester M13 9PT



U.O. ANATOMIA PATOLOGICA

Direttore: Prof. Fabio Facchetti

Tel: 030-3995378-830 Fax: 030-3995377

Email: anatomia.patologica@asst-spedalivicili.it

1. RAZIONALE DELLO STUDIO

Il carcinoma della vescica è rappresentato per il 90% dei casi dall'istotipo a cellule transizionali (TCC) e per il restante 10% da istotipi meno comuni quali il carcinoma squamoso e l'adenocarcinoma. I TCC possono essere suddivisi in 2 macrocategorie per comportamento biologico e significato clinico-prognostico: non-muscolo invasivi (NMI) e muscolo invasivi (MI). La sostanziale inefficacia delle terapie ad oggi disponibili per il trattamento del carcinoma muscolo-invasivo in stadio avanzato e la conseguente prognosi infausta rendono necessari ulteriori studi più approfonditi. Nel corso degli ultimi anni si è sviluppato un interesse crescente per lo studio del comportamento biologico e delle caratteristiche cellulari e molecolari di questa neoplasia. Tuttavia aspetti chiave della sua trasformazione e progressione non sono ad oggi ancora stati chiariti a causa della complessità biologica della malattia.

Il cancro della vescica risulta essere molto rappresentato sia in termini di incidenza (4° tumore più frequente nel maschio e 17° nella femmina nel mondo) che di mortalità (165.000 i morti all'anno nel mondo) (*Ferlay J. et al., 2010*). Un aspetto assai critico è che fino ad oggi non sono stati apportati miglioramenti sostanziali nel suo trattamento, specificatamente per la malattia muscolo invasiva avanzata. L'indicazione terapeutica per la malattia infiltrante prevede la cistectomia radicale associata a una chemioterapia adiuvante (*AIOM, Linee Guida Carcinoma della Vescica. 2013*). Tali terapie hanno un alto costo in termini di qualità di vita per il paziente e non garantiscono una risposta soddisfacente, la chemioterapia risulta infatti efficace solo nel 30-40% dei casi. Inoltre non si è ancora in grado di riconoscere anticipatamente i pazienti *responders* (*Shah J.B. et al., 2011*).

Nell'uomo e nel topo sono stati condotti numerosi studi che sostengono l'ipotesi dell'origine del tumore della vescica a partire dalle cellule basali dell'urotelio. Infatti all'interno dell'epitelio della vescica risiedono cellule basali inizianti il tumore (TICs). Le cellule TICs risiedono in larghe aree monoclonali tra il tumore, che risulta essere invasivo e resistente alle terapie *standard*, e lo stroma. Le TICs hanno caratteristiche basali, quali la positività per l'antigene di superficie CD44 (CD44+), la citocheratina 5 (CK5+) e negatività per la citocheratina 20 (CK20-) (*Mai K.T. et al., 2015*).

In studi recenti è stata approfondita la maggiore comprensione molecolare del carcinoma uroteliale. In modo interessante è stato scoperto che sia la malattia di alto grado, sia i casi di basso grado, possono essere classificati in diversi sottotipi molecolari, in base all'espressione di biomarcatori basali e di differenziazione tumorale. Sono stati quindi evidenziati diversi sottogruppi tumorali di cellule uroteliali che stratificano il tumore della vescica (*Kobayashi T. et al., 2015*). Il nuovo modello di classificazione suggerito dai diversi autori (*Sjodahl G. et al., 2012; Damrauer J.S. et al., 2014; Choi W. et al., 2014; The Cancer Genome Atlas Research, 2014; Hedegaard J. et al., 2016*), dei tumori della vescica "a due pathway", si basa sulla patogenesi e sulla biologia molecolare del tumore, prendendo in considerazione sia le caratteristiche istopatologiche che quelle molecolari. Tale classificazione, in analogia ai sottotipi molecolari del cancro mammario, ha il fine di stratificare i tumori



Presidio Ospedaliero
di Brescia

Sistema Socio Sanitario



Regione
Lombardia

ASST Spedali Civili



Università
degli Studi
di Brescia

U.O. ANATOMIA PATOLOGICA

Direttore: Prof. Fabio Facchetti

Tel: 030-3995378-830 Fax: 030-3995377

Email: anatomia.patologica@asst-spedalivicili.it

vescicali in base a caratteristiche molecolari rilevanti sia a fini prognostici che predittivi di risposta a nuovi bersagli farmacologici.

In tale contesto è nota l'attivazione del fattore di trascrizione STAT3 nelle cellule tumorali uroteliali, soprattutto nei tumori di tipo invasivo (*Ho P.L. et al., 2012*). La proteina STAT3 a valle della via molecolare JAK2/STAT3, è coinvolta in diversi meccanismi biologici, tra cui la promozione della crescita e della sopravvivenza cellulare. L'attivazione costitutiva delle proteine JAK2 o STAT3, è stata associata alla trasformazione maligna in diverse neoplasie. In alcuni tumori solidi, STAT3 è un proto-oncogene che attiva altri oncogeni, come c-myc, ciclina D e la proteina anti-apoptotica Bcl-xL, causando la deregolazione dell'apoptosi, l'aumento della proliferazione e la trasformazione cellulare (*Yu, H. and R. Jove, 2004; Yu H. et al., 2014*). Mentre mutazioni attivanti di JAK2 sono *driver* in malattie mieloproliferative (*Saeidi K. et al., 2016*).

Dati recenti supportano inoltre un ruolo potenziale di ERK5 nella tumorigenesi/progressione tumorale. L'attivazione della *extracellular-signal-regulated kinase* (ERK5) è stato associato con la trasduzione di un segnale mitogenico (*Perez-Madrigal D., Finegan K.G., Paramo B., Tournier C., Cell Signal. 2012*). Tuttavia, l'ipotesi che ERK5 sia un regolatore critico della proliferazione cellulare, e che la sua modulazione possa avere un significato terapeutico, deve essere indagato nel carcinoma della vescica.

Il progetto verterà sull'idea di esplorare l'espressione e lo stato di attivazione di molecole segnale (come STAT3, JAK2 ed ERK5), in vivo (pazienti e modelli animali) e in vitro, e nella rilevanza clinica del tumore della vescica. Il presente studio si prefigge di caratterizzare il ruolo di potenziali molecole bersaglio (STAT3, JAK2, ERK5) nel controllo della crescita tumorale locale e a distanza. Si porrà attenzione alle diverse pathway molecolari (in particolare JAK/STAT, EGFR/ERK, FGF/FGFR) attivate nelle cellule tumorali vescicali, ottenute sia da tessuto che da liquidi biologici (sangue periferico, urine) di pazienti affetti da neoplasie vescicali.

2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

L'obiettivo primario dello studio consiste nella caratterizzazione biologica e molecolare dei carcinomi vescicali, attraverso lo studio delle alterazioni cellulari e molecolari implicate nella trasformazione e progressione di tali neoplasie. I dati ottenuti da tale analisi verranno correlati alle caratteristiche cliniche dei TCC mediante studio di coorti retrospettive e prospettive. Tale correlazione potrebbe permettere d'individuare precocemente pazienti ad alto rischio di progressione di malattia da avviare immediatamente a provvedimenti radicali o identificare molecole target per nuovi farmaci antitumorali.



Presidio Ospedaliero
di Brescia

Sistema Socio Sanitario



Regione
Lombardia

ASST Spedali Civili



Università
degli Studi
di Brescia

U.O. ANATOMIA PATOLOGICA

Direttore: Prof. Fabio Facchetti

Tel: 030-3995378-830 Fax: 030-3995377

Email: anatomia.patologica@asst-spedalivicili.it

3. DISEGNO DELLO STUDIO

Al fine della realizzazione del progetto si prevedono due fasi di studio. Una fase iniziale di screening (**Fase 1**) della presenza, distribuzione e quantità delle molecole target su materiale d'archivio (blocchi tumorali inclusi in paraffina) relativo alle principali neoplasie vescicali (MI, NMI). La fase di screening sarà poi seguita da arruolamento attivo di nuovi casi (**Fase 2**) per la raccolta e studio di materiale biologico fresco e per la generazione di sistemi cellulari. Nella **Fase 3** è previsto lo svolgimento di sperimentazione su modelli animali geneticamente modificati, fase per la quale è stata richiesta autorizzazione ministeriale. Si segnala che nel corso del 2016 sono stati effettuati esperimenti con costi di personale e reagenti a totale carico del PI.

4. ASPETTI ETICI

Questo studio sarà condotto in accordo con il presente protocollo, con i principi di buona pratica clinica, in applicazione alla dichiarazione di Helsinki. Il progetto ha ricevuto approvazione da parte del Comitato Etico Provinciale di Brescia (codice NP2483)

5. PERSONALE COINVOLTO

Il personale coinvolto nel progetto include oltre ai collaboratori di cui sopra (impegno a tempo parziale) due unità/anno rispettivamente per condurre gli esperimenti in vitro (oggi in carico alla Dr.ssa Francesca Tenca) e su tessuto (oggi in carico alla Dr.ssa Laura Melocchi).

6. FATTIBILITA' DEL PROGETTO

Nel corso degli ultimi due anni il laboratorio del proponente ha generato un set di dati preliminari (inclusi in due Tesi di Laurea Magistrale di Medicina e Biotecnologie Mediche) che hanno permesso di gettare le basi sperimentali delle nuove fasi progettuali. In particolare, nel 2016, anche attraverso la collaborazione con il laboratorio della Dr.ssa Cathy Tournier (Università di Manchester), è stato possibile generare un set di dati preliminari che suggerisce un ruolo chiave della proteina ERK5 nella trasformazione cellulare del TCC. Il proponente Prof. Vermi afferisce al DMMT e dispone di spazi di laboratorio e strumentazione per svolgere tutte le fasi proposte compresa la parte di sperimentazione animale. La collaborazione con il Prof. Simeone/Dr. Cristinelli è garante della disponibilità di materiale biologico di pazienti affetti da TCC ben caratterizzati dal punto di vista clinico. Nel periodo 2015-2016 sono state caratterizzate dal punto di



U.O. ANATOMIA PATOLOGICA

Direttore: Prof. Fabio Facchetti

Tel: 030-3995378-830 Fax: 030-3995377

Email: anatomia.patologica@asst-spedalivicili.it

vista biologico (crescita in vitro e nell'animale in diverse condizioni sperimentali) un set di linee di TCC disponibile per le future fasi sperimentali.

7. PIANO FINANZIARIO

| | Primo anno (2016) | Secondo anno (2017) | Terzo anno (2018) | Totale |
|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|-------------------|
| Costi diretti | | | | |
| Reagenti | *10.000,00 | *15.000,00 | 35.000,00 | 60.000,00 |
| Strumentazioni | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Costi pubblicazione | 0,00 | 0,00 | 4.000,00 | 4.000,00 |
| Meeting | 0,00 | 3.000,00 | 3.000,00 | 6.000,00 |
| Personale | | | | |
| Fellow 1** | 0,00 | 9.000,00 | 18.000,00 | 27.000,00 |
| Fellow 2*** | 0,00 | 12.000,00 | 24.000,00 | 36.000,00 |
| Totale | 10.000,00 | 39.000,00 | 84.000,00 | 133.000,00 |

* costi sostenuti dal PI proponente

** Borsa di ricerca dal costo lordo di Euro 1.500,00/mese

*** Borsa di ricerca dal costo lordo di Euro 2.000,00/mese

8. BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
2. AIOM, *Linee guida del carcinoma della vescica*. 2013.
3. Shah, J.B., D.J. McConkey, and C.P. Dinney, *New strategies in muscle-invasive bladder cancer: on the road to personalized medicine*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(9): p. 2608-12.
4. Mai, K.T., et al., *Invasive urothelial carcinoma exhibiting basal cell immunohistochemical markers: A variant of urothelial carcinoma associated with aggressive features*. Pathol Res Pract, 2015. **211**(8): p. 610-8.
5. Kobayashi, T., et al., *Modelling bladder cancer in mice: opportunities and challenges*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(1): p. 42-54.



U.O. ANATOMIA PATOLOGICA

Direttore: Prof. Fabio Facchetti

Tel: 030-3995378-830 Fax: 030-3995377

Email: anatomia.patologica@asst-spedalivicili.it

6. Sjordahl, G., et al., *A molecular taxonomy for urothelial carcinoma*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(12): p. 3377-86.
7. Damrauer, J.S., et al., *Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(8): p. 3110-5.
8. Choi, W., et al., *Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy*. Cancer Cell, 2014. **25**(2): p. 152-65.
9. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma*. Nature, 2014. **507**(7492): p. 315-22.
10. Hedegaard, J., et al., *Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma*. Cancer Cell, 2016.
11. Ho, P.L., et al., *Stat3 activation in urothelial stem cells leads to direct progression to invasive bladder cancer*. Cancer Res, 2012. **72**(13): p. 3135-42.
12. Yu, H. and R. Jove, *The STATs of cancer--new molecular targets come of age*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 97-105.
13. Yu, H., et al., *Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(11): p. 736-46.
14. Saeidi, K., *Myeloproliferative neoplasms: Current molecular biology and genetics*. Crit Rev Oncol Hematol, 2016. **98**: p. 375-89.
15. Perez-Madrigal, D., et al., *The extracellular-regulated protein kinase 5 (ERK5) promotes cell proliferation through the down-regulation of inhibitors of cyclin dependent protein kinases (CDKs)*. Cell Signal, 2012. **24**(12): p. 2360-8.
16. di Martino, E., D.C. Tomlinson, and M.A. Knowles, *A Decade of FGF Receptor Research in Bladder Cancer: Past, Present, and Future Challenges*. Adv Urol, 2012. **2012**: p. 429213.
17. Lim, S., et al., *Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Overexpression Is Associated with Poor Survival in Patients with Resected Muscle Invasive Urothelial Carcinoma*. Yonsei Med J, 2016. **57**(4): p. 831-9.
18. Bottazzi, B., et al., *The pentraxins PTX3 and SAP in innate immunity, regulation of inflammation and tissue remodelling*. J Hepatol, 2016. **64**(6): p. 1416-27.
19. Ronca, R., et al., *Long pentraxin-3 inhibits epithelial-mesenchymal transition in melanoma cells*. Mol Cancer Ther, 2013. **12**(12): p. 2760-71.
20. Ronca, R., et al., *Long pentraxin-3 as an epithelial-stromal fibroblast growth factor-targeting inhibitor in prostate cancer*. J Pathol, 2013. **230**(2): p. 228-38.
21. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. Science, 2011. **331**(6024): p. 1565-70.
22. Vesely, M.D., et al., *Natural innate and adaptive immunity to cancer*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 235-71.
23. Tosolini, M., et al., *Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer*. Cancer Res, 2011. **71**(4): p. 1263-71.
24. Mlecnik, B., et al., *Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction*. J Clin Oncol, 2011. **29**(6): p. 610-8.



Presidio Ospedaliero
di Brescia

Sistema Socio Sanitario



Regione
Lombardia

ASST Spedali Civili



Università
degli Studi
di Brescia

U.O. ANATOMIA PATOLOGICA

Direttore: Prof. Fabio Facchetti

Tel: 030-3995378-830 Fax: 030-3995377

Email: anatomia.patologica@asst-spedalivicili.it

25. Pages, F., et al., *In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(35): p. 5944-51.
26. Galon, J., et al., *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. Science, 2006. **313**(5795): p. 1960-4.
27. Pages, F., et al., *Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(25): p. 2654-66.
28. Horn, T., et al., *The prognostic effect of tumour-infiltrating lymphocytic subpopulations in bladder cancer*. World J Urol, 2016. **34**(2): p. 181-7.
29. Hodi, F.S., et al., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(8): p. 711-23.
30. Rosenberg, J.E., et al., *Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial*. Lancet, 2016. **387**(10031): p. 1909-20.
31. Powles, T., et al., *MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer*. Nature, 2014. **515**(7528): p. 558-62.

Brescia, 07 Febbraio 2017

Responsabile Scientifico

Prof. William Vermi

CONTATTI

Prof. William Vermi

DMMT, Università degli Studi di Brescia

ASST-Spedali Civili di Brescia, UO Anatomia Patologica

Telefono 0303998425

mail: william.vermi@gmail.com; william.vermi@unibs.it