

LE CELLULE NATURAL KILLER

UNA SPERANZA PER COMBATTERE TUMORI E LEUCEMIE

di *Lorenzo Moretta**

Un campo di ricerca, quello dell'immunologia, ancora per molti versi da esplorare e da cui tutti si aspettano scoperte che aprano prospettive terapeutiche per le malattie più gravi. Una scoperta recentissima, la comprensione dei meccanismi molecolari che regolano l'attivazione e la funzione di particolari cellule del sistema immunitario, le cellule Natural Killer, è raccontata da uno dei suoi autori, direttore scientifico del prestigioso Istituto Gaslini di Genova. Si illustrano i passi che hanno portato il gruppo di ricercatori italiani a scoprire sia i «recettori inibitori» che i «recettori attivatori» e a clonarne i geni - tra l'altro con un metodo originale -, riuscendo a spiegare la capacità delle cellule NK di uccidere le cellule tumorali o le cellule infettate da virus, risparmiando quelle normali. E si spiegano in termini scientificamente realistici le possibili ricadute in campo terapeutico. Una lettura che apre nuove prospettive di apprendimento e un'occasione da non perdere per comunicare agli studenti le tappe di una nuova conquista della scienza nel campo dell'immunologia.



*Istituto Giannina Gaslini e Università degli Studi di Genova.

Le cellule *Natural Killer* (NK) sono uno dei principali attori della cosiddetta immunità innata, vale a dire l'insieme di quelle componenti delle nostre difese comparse precocemente nell'evoluzione e che costituiscono vere e proprie fondamenta di tutto il sistema immunitario. Le cellule NK furono originariamente identificate su base puramente funzionale, in relazione alla loro capacità di uccidere varie linee tumorali senza una previa attivazione (strettamente necessaria nel caso dei linfociti T). Proprio questa caratteristica funzionale ne ha determinato la denominazione di «killer naturale». Si tratta di una popolazione linfoide che, a differenza

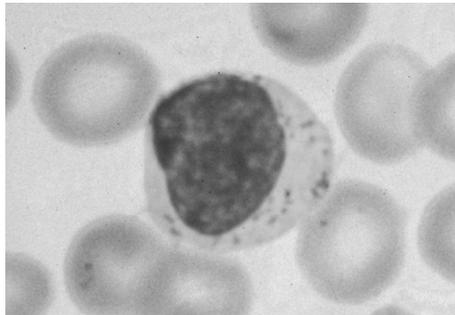


Immagine al microscopio ottico di una cellula NK in uno striscio di sangue periferico in cui sono visibili anche alcuni globuli rossi. I granuli, visibili nel citoplasma, contengono soprattutto perforine e granzimi, fondamentali per l'attività killer che le cellule NK possono esercitare prontamente.

dei linfociti T e B, non esprime recettori distribuiti clonalmente specifici per i vari antigeni. In condizioni normali, le cellule NK sono presenti pressoché esclusivamente nel sangue periferico, nel midollo osseo o nella milza. Possono tuttavia migrare nei tessuti sede di infiammazione in risposta a mediatori chemiotattici prodotti da varie cellule infiammatorie. Le cellule NK giocano un ruolo centrale nelle difese dell'immunità innata essendo in grado di prevenire la rapida disseminazione di tumori metastatici (per lo meno in modelli sperimentali del topo) e per giocare un ruolo cruciale nelle difese contro alcuni virus citopatici, soprattutto virus di tipo *Herpes*. In seguito ad attivazione, le cellule NK rilasciano citochine e chemiochine che inducono risposte infiammatorie, controllano l'emopoiesi e la generazione di cellule dendritiche (DC), attivano la funzione dei macrofagi e dei granulociti. Sono infine in grado di influenzare le risposte mediate dai linfociti T, inducendo una risposta polarizzata di tipo TH1 particolarmente efficace contro vari agenti patogeni. Pertanto, in condizioni patologiche nelle quali si verifichi un'attivazione precoce delle cellule NK, si potranno avere importanti effetti (sia qualitativi che quantitativi) sulla seguente risposta adattativa. Nonostante la loro rilevanza nei meccanismi di difesa, per molti anni dopo la loro scoperta le cellule NK sono rimaste «misteriose» per quanto riguarda la comprensione dei meccanismi molecolari che ne regolano la funzione e la capacità di discriminare tra cellule normali e cellule tumorali. Tuttavia, in anni recenti si è assistito a una rapida evoluzione delle nostre conoscenze sulle cellule NK. Abbiamo ora un'idea abbastanza precisa sui meccanismi che regolano l'attivazione e la funzione delle cellule NK. In particolare è stato chiarito il meccanismo che permette alle cellule NK di uccidere le cellule tumorali o le cellule infettate da virus, risparmiando quelle normali.

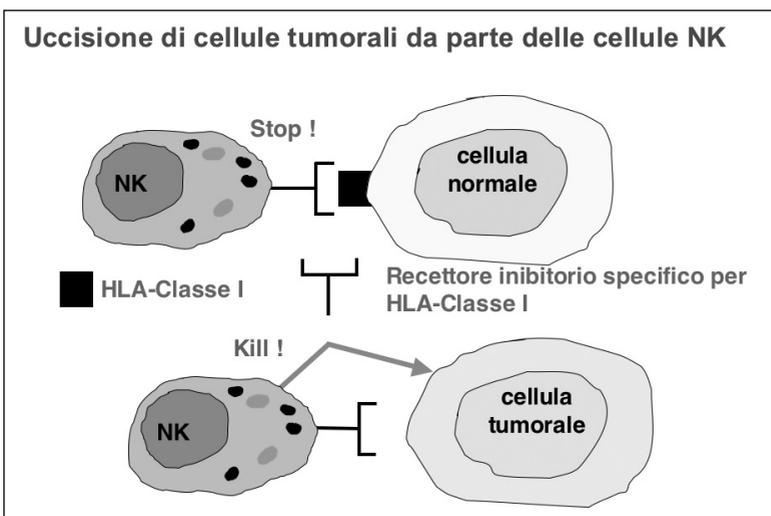
Cellule NK e antigeni MHC

Le cellule NK ricevono un segnale di stop quando entrano in contatto con gli antigeni di istocompatibilità (MHC) di classe I

Era stata originariamente osservata una correlazione inversa tra l'espressione di molecole MHC di Classe I da parte di cellule tumorali e la loro suscettibilità alla lisi NK-mediata. Questo aveva suggerito che le molecole MHC potessero esercitare un ruolo «protettivo» impedendo che le cellule NK uccidessero cellule normali o comunque cellule che esprimono livelli sufficienti di molecole MHC. Proprio il *deficit* di espressione di MHC, tipico di molte cellule tumorali e di cellule infettate da alcuni virus era stata suggerita quale causa della suscettibilità alla lisi NK-mediata (tale ipotesi formulata da Karre, è conosciuta come *missing self hypothesis*). Lo studio delle NK umane e la messa a punto di una tecnica che ha portato alla loro clonazione *in vitro* ha permesso al nostro laboratorio di giungere alla

scoperta che le cellule NK sono in grado di discriminare tra diversi gruppi di alleli di molecole HLA di classe I (vale a dire gli antigeni di istocompatibilità MHC dell'uomo). Questo dato presupponeva però la presenza, sulle cellule NK, di recettori specifici per antigeni HLA. Un altro presupposto importante era che tali recettori dovessero avere una funzione inibitoria, poichè il riconoscimento di antigeni HLA risultava nel blocco della funzione NK. I prototipi di tali recettori inibitori furono identificati e caratterizzati nel nostro laboratorio. Denominati p58.1 e p58.2, riconoscono in maniera precisa due differenti gruppi di alleli dell'HLA-C (gruppo 1 e gruppo 2). Altri recettori, strutturalmente simili a p58.1 e p58.2, ma con specificità per gruppi di alleli dell'HLA-B ed HLA-A, furono identificati nel nostro e in altri laboratori. Collettivamente, i recettori delle cellule NK in grado di riconoscere specificità alleliche, sono denominati *Killer Ig-like Receptors* (KIR). Esistono altri recettori inibitori coinvolti nel riconoscimento di HLA, denominati CD94-NKG2A e ILT2. Tuttavia sono recettori più «promiscui» che non sono in grado di riconoscere specificità alleliche. È importante notare che ciascun tipo di KIR non è espresso da tutte le cellule NK di un determinato individuo, ma solamente da una frazione di queste. Inoltre, tutte le cellule NK mature esprimono almeno un recettore specifico per molecole HLA-classe I proprie (*self*). La distribuzione clonale dei recettori e la capacità da parte dei KIR di riconoscere gruppi di alleli HLA permette alla popolazione cellulare NK, nel suo insieme, di identificare cellule che abbiano perduto anche un singolo allele HLA-Cl I e di eliminarle.

È opportuno sottolineare che tali cellule sono potenzialmente pericolose trattandosi di cellule tumorali o di cellule infettate da virus particolarmente aggressivi.



Modello semplificato dei meccanismi molecolari coinvolti nell'attività citolitica delle cellule NK

I recettori inibitori specifici per molecole HLA-classe I espressi sulle cellule NK prevengono l'uccisione delle cellule normali «protette» dalla presenza di tali molecole sulla loro superficie.

Le cellule tumorali, frequentemente caratterizzate da difetti di espressione di HLA-classe I, vengono uccise in quanto il meccanismo di innescamento dei recettori inibitori non può avere luogo. Le cellule NK forniscono pertanto un meccanismo di difesa rapido e importante.

Modalità di attivazione delle cellule NK

L'inattivazione delle cellule NK mediata dai recettori inibitori specifici per antigeni HLA-classe I rappresenta un importante meccanismo di sicurezza per evitare danni non voluti alle cellule normali (che esprimono antigeni HLA-Cl I). Questo significa che le cellule NK, in seguito a interazione con potenziali cellule bersaglio, ricevono un segnale di attivazione. E presuppone l'esistenza di recettori NK di tipo attivatorio che trasmettono un segnale in seguito al contatto con strutture (ligandi) espresse sulle cellule bersaglio. Questi recettori attivatori sono stati scoperti solo pochi anni fa dal nostro gruppo che ne ha anche clonato i geni. Denominati collettivamente «recettori della citotossicità naturale» (*natural cytotoxicity receptors*, NCR), sono costituiti da NKp46, NKp30 e NKp44. Gli NCR giocano un ruolo predominante nell'uccisione della maggior parte delle linee di cellule tumorali umane. L'NKp44 è un recettore particolarmente interessante, in quanto espresso dalle cellule NK solo dopo la loro attivazione. Un altro recettore attivatorio espresso dalle cellule NK e da cellule T citolitiche è l'NKG2D che riconosce MICA e MICB e ULBP, molecole assenti su cellule normali ma espresse, per esempio, in seguito a *stress* cellulare o a trasformazione tumorale. Sebbene i ligandi cellulari degli NCR non siano ancora stati identificati, le informazioni disponibili sono compatibili con una loro espressione prevalente (se non esclusiva) in cellule in rapida proliferazione, attivate da citochine o in cellule «stressate» da temperatura elevata, da un'infezione virale o da trasformazione tumorale. Se davvero i vari ligandi per i recettori attivatori delle cellule NK sono espressi solamente da cellule stressate, la possibilità di attivare le cellule NK sarebbe in realtà limitata solo a cellule potenzialmente pericolose. Questo significa che le cellule NK sono attivate solo quando necessario, cioè quando incontrano cellule che può essere opportuno eliminare. La «decisione» se eliminarle o meno è dettata poi dal monitoraggio, da parte dei recettori inibitori, di una eventuale diminuzione di espressione di antigeni HLA-classe I (che si verifica su cellule tumorali o infettate da virus, ma non su cellule normali).

Evoluzione delle cellule NK: adattamento all'immunità specifica

Le cellule NK sono state a lungo considerate come cellule effettrici non specifiche e «primitive». In realtà questo concetto è ampiamente superato. Infatti si sono notevolmente evolute per integrare la loro azione con l'immunità adattativa (o specifica) mediata dai linfociti T e B. Si pensi per esempio all'espressione di recettori in grado di rico-

noscere la porzione Fc degli anticorpi IgG (gli anticorpi sono prodotti tipici dell'immunità specifica) e alla produzione di varie citochine in grado di regolare la funzione dei linfociti T e B. Inoltre hanno acquisito un importante meccanismo di sicurezza mediato dai recettori inibitori specifici per HLA-Cl I, particolarmente dai KIR, (in grado di riconoscere forme alleliche di tali molecole). Tale meccanismo sofisticato è di recente evoluzione. Infatti, nei roditori non esistono KIR, che sono peraltro sostituiti da recettori strutturalmente molto diversi anche se con funzione analoga. Importanti differenze nell'espressione e nella specificità dei KIR sono state anche osservate nello scimpanzé (la dicotomia tra uomo e scimpanzé risale a «solo» 5 milioni di anni fa). Questo significa che i KIR si sono evoluti in tempi relativamente recenti, proprio come gli antigeni di istocompatibilità HLA.

Cellule NK e cellule dendritiche (DC)

Le DC, come le NK, sono cellule molto importanti dell'immunità innata. Giocano entrambe un ruolo fondamentale nell'immunità innata e tra questa e l'immunità specifica. Quest'ultima infatti, per poter essere indotta, dipende strettamente dalla funzione delle DC, le principali cellule in grado di presentare l'antigene ai linfociti T *helper*. I linfociti T *helper* sono responsabili dell'innescamento di tutte le risposte dell'immunità specifica. Le DC possono derivare direttamente dalle cellule staminali emopoietiche CD34+ oppure dai monociti presenti nel sangue, sotto l'effetto di citochine quali il GM-CSF, l'IL-4 e gli interferoni di tipo I (α e β). Queste citochine sono in grado di promuoverne la maturazione fino allo stadio di DC immatura (iDC). Le iDC esprimono poche molecole HLA sulla loro superficie cellulare, mentre ne hanno in abbondanza nel citoplasma. Sono poi caratterizzate da una notevole capacità di catturare gli antigeni (per esempio batteri e virus) grazie a una fagocitosi e a una macropinocitosi molto efficiente. Sono inoltre in grado di produrre grandi quantità di citochine proinfiammatorie primarie (es. IL-1 e TNF- α), vale a dire i principali mediatori dell'infiammazione. Le iDC sono localizzate in vari tessuti dove catturano gli agenti patogeni e interagiscono con i loro prodotti (ad esempio con il lipopolisaccaride, LPS, dei batteri gram-negativi o con acidi nucleici virali). Queste interazioni e/o le stesse citochine proinfiammatorie TNF- α e IL-1 inducono la maturazione delle iDC a DC mature (mDC). Queste ultime sono caratterizzate da una elevata espressione di HLA, dall'espressione di molecole co-stimolatorie quali il CD80 e il CD86 (anche noti come B7.1 e B7.2), fondamentali per indurre l'attivazione dei linfociti T *naive* (vale a dire linfociti T che non hanno mai

**Interazioni
tra cellule NK
e cellule
dendritiche (DC),
due importanti
attori dell'immunità
innata**

incontrato l'antigene). La migrazione delle DC nei linfonodi, dove avverrà l'incontro con i linfociti T *helper*, è reso possibile dall'espressione del recettore CCR7 sulle DC in fase di maturazione. Questo recettore riconosce specificamente due chemochine, denominate ELC e SLC, prodotte a livello dei linfonodi e che quindi attraggono le DC. Dati recenti ottenuti dal nostro gruppo hanno dimostrato come l'interazione tra cellule NK e DC risulti in una serie di fenomeni di particolare rilievo. Innanzi tutto le cellule NK, a contatto con le DC iniziano a proliferare grazie a citochine prodotte dalle DC.

Inoltre, una volta attivate, le cellule NK sono in grado di uccidere le iDC stesse. Queste ultime esprimono bassi livelli di HLA e non sono quindi «protette» dalle cellule NK. È molto probabile che l'interazione tra cellule NK e DC possa giocare un ruolo molto importante nella modulazione della risposta immunitaria. Le cellule NK infatti potrebbero esercitare un controllo di qualità sulla DC, eliminando iDC in eccesso. Per esempio, se queste ultime non sono indotte a maturare per mancanza di prodotti microbici (per esempio l'infezione è stata controllata ed è terminata), viene a esaurirsi il loro ruolo principale. Le cellule NK avrebbero quindi il ruolo di eliminare iDC non più utili e potenzialmente dannose (data la loro capacità di produrre grandi quantità di citochine proinfiammatorie).

Le cellule NK nella terapia dei tumori

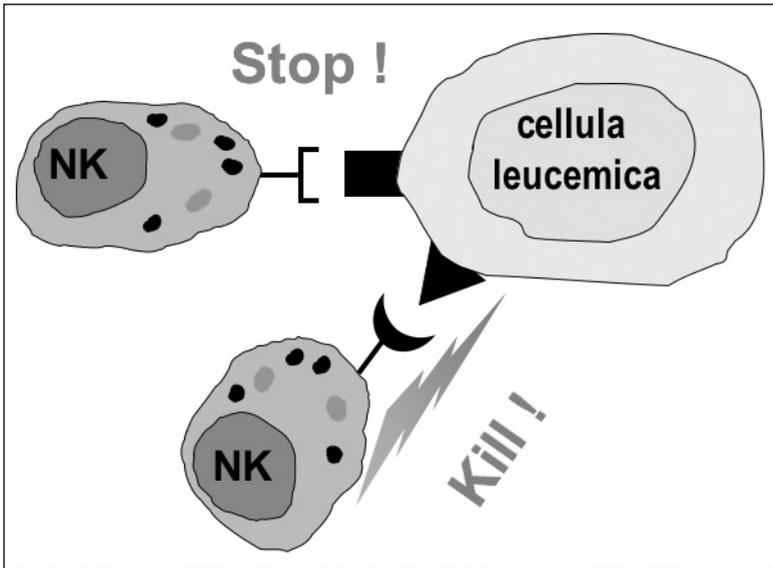
Potenziale utilizzo delle cellule NK: l'esempio delle leucemie mieloidi acute

La potente attività *killer* delle cellule NK ha suggerito un loro possibile impiego nella terapia dei tumori.

Tentativi di immunoterapia adottiva con cellule NK per curare tumori metastatici avanzati (soprattutto melanomi) hanno dato in passato qualche risultato di interesse. Cellule NK autologhe, dopo averne indotto l'attivazione e proliferazione *in vitro* e averle reinfuse nel paziente, erano in grado di eliminare masse tumorali rilevanti, per lo meno in certi distretti, soprattutto nei polmoni. Non avevano però alcun effetto significativo su altre localizzazioni del tumore.

Il fatto però che le cellule NK fossero in grado di esercitare un effetto antitumorale anche *in vivo* ha fornito una base razionale per uno sfruttamento terapeutico delle cellule NK. Per esempio, un approccio più recente ha portato a importanti risultati nella terapia delle leucemie mieloidi acute grazie all'intervento di cellule NK derivate da cellule staminali emopoietiche nel corso di trapianto di midollo allogenico.

Per comprendere questo approccio è opportuno spiegare il concetto di «alloreattività» delle cellule NK. In genere, l'uccisione NK-mediata di cellule *self* avverrà solo quando queste hanno perso l'espressione di molecole HLA-Cl I. Per contro, se le cellule NK interagiscono



Nel trapianto di midollo aploidentico una parte delle cellule NK del donatore (originate dalle cellule staminali emopoietiche contenute nel midollo) può esprimere KIR che non riconoscono alleli HLA-classe I del paziente (denominate NK «alloreattive»). Grazie a questo meccanismo le cellule NK possono eliminare le cellule leucemiche residue prevenendo le ricadute leucemiche. Le cellule normali del paziente non sono attaccate dalle NK perché non esprimono i ligandi riconosciuti dai recettori NK attivatori.

con cellule allogeniche (di un altro individuo) è possibile che uno o più recettori KIR (specifici per determinanti allelici dell'HLA-Cl I) non riconoscano gli alleli HLA espressi dalle cellule allogeniche. Pertanto le cellule NK, non essendo inibite dall'interazione KIR/HLA, potranno esercitare attività citotossica contro le cellule allogeniche e produrre citochine in grado di esercitare vari effetti biologici. Queste cellule NK «alloreattive» furono identificate nel nostro laboratorio alla fine degli anni Ottanta.

Va ricordato che il trapianto di midollo allogenico (vale a dire quando il donatore è un individuo non identico appartenente alla stessa specie) può curare una leucemia mieloide grazie a due meccanismi. Innanzi tutto, il regime di «condizionamento», basato sull'uso di chemioterapia e radioterapia ad alte dosi, ha lo scopo di eliminare il numero più elevato possibile di cellule leucemiche (idealmente tutte). Poi l'effetto citotossico dei linfociti T presenti nel midollo trapiantato, in grado di riconoscere alloantigeni espressi sulle cellule leucemiche residue dopo il regime di condizionamento.

Queste cellule, se non eliminate, sono responsabili delle ricadute leucemiche. Il rovescio della medaglia è che gli alloantigeni riconosciuti dai linfociti T sono espressi anche su tessuti normali del paziente e questo causa la reazione di rigetto contro l'ospite (GvHD) che può avere conseguenze gravi, talvolta anche mortali.

Un midollo allogenico compatibile è mediamente disponibile in circa il 60% dei casi (da familiare o da donatore HLA identico non correlato).

Per il restante 40% non è possibile ottenere un midollo compatibile in tempo utile. Per questi pazienti (con prognosi estremamente sfavorevole) è stato sviluppato il trapianto di midollo «aploidentico», vale a dire da un donatore che ha la metà degli antigeni HLA identici al paziente e l'altra metà differenti: tipico è l'esempio del trapianto in cui il donatore è un genitore. In questo tipo di trapianto il paziente avrà metà del corredo genetico di origine materna e metà di origine paterna.

Dato il notevole grado di incompatibilità, è strettamente necessario eliminare tutte le cellule T dal midollo da trapiantare per evitare GvHD mortali. Il trapianto di midollo aploidentico è diventato una realtà clinica di notevole successo, anche se limitato a pochi centri, dato la sua complessità.

Nel trapianto aploidentico potrà verificarsi una delle seguenti condizioni. In un primo caso: le cellule NK originate dalle cellule staminali del donatore esprimono KIR che non riconoscono le molecole HLA-classe I espresse del paziente; le cellule NK del trapianto saranno «alloreattive» come nell'immagine di pagina precedente.

In un secondo caso: le cellule NK esprimono KIR che riconoscono gli alleli HLA del ricevente in quanto gli alleli del paziente, anche se diversi da quelli del donatore, appartengono agli stessi gruppi di specificità alleliche riconosciute dai KIR del donatore. Quindi non saranno alloreattive.

I risultati clinici in pazienti trapiantati appartenenti alle due categorie hanno dimostrato differenze drammatiche. Infatti, nel primo caso, quando erano presenti cellule NK alloreattive, la sopravvivenza a 5 anni è risultata di circa il 60%. Nel secondo caso, inferiore al 5%. Nel primo caso, la sopravvivenza elevata è dovuta principalmente all'eliminazione delle cellule leucemiche residue da parte delle cellule NK alloreattive e, di conseguenza, alla prevenzione delle ricadute leucemiche, frequente causa di morte.

È lecito chiedersi come mai le cellule NK dei pazienti non siano in grado di proteggerli dalla leucemia. Innanzi tutto le leucemie possono esprimere livelli di molecole HLA-classe I sufficienti a proteggerle da cellule NK autologhe. In secondo luogo, abbiamo dimostrato che le cellule NK di pazienti con leucemia mieloide acuta non esprimono a sufficienza recettori attivatori (vedi sopra). Questo inevitabilmente causa una inefficiente capacità *killer*.

In conclusione, le cellule NK, poco conosciute fino a pochi anni or sono, hanno assunto un ruolo molto importante perché è stato chiarito come funzionano e perché sono in grado di uccidere tumori e leucemie. Proprio questa loro capacità funzionale ha acceso molte speranze e ha stimolato studi per definire nuove modalità terapeutiche basate sul loro utilizzo nella terapia dei tumori. ❖