



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA

*SCUOLA DI DOTTORATO DI
SCIENZE DELLA VITA E DELLA SALUTE*

*DOTTORATO DI RICERCA IN
INFIAMMAZIONE, IMMUNITA' E CANCRO*

XXX CICLO (2014)

**CARATTERISTICHE CLINICO-PATOLOGICHE, PROFILO MOLECOLARE E
BERSAGLI PER L'IMMUNOTERAPIA NEI CARCINOMI INDIFFERENZIATI DEL
PANCREAS CON CELLULE GIGANTI SIMIL-OSTEOCLASTICHE**

S.S.D. MED/08

Coordinatore: **Prof.ssa GABRIELA CONSTANTIN**

Tutor: **Prof. ALDO SCARPA**

Dottorando: **Dott. CLAUDIO LUCHINI**

**Caratteristiche clinico-patologiche, profilo molecolare e bersagli per l'immunoterapia nei
carcinomi indifferenziati del pancreas con cellule giganti simil-osteoclastiche**

Tesi di dottorato – Claudio Luchini
Verona, 15 dicembre 2017

SOMMARIO

Il carcinoma del pancreas è una neoplasia maligna con elevatissimo tasso di mortalità. Lo studio dell'adenocarcinoma duttale convenzionale (PDAC) e delle sue varianti può aiutare a comprenderne meglio la biologia. Scopo di questa tesi è lo studio di una variante di PDAC, il carcinoma indifferenziato del pancreas con cellule giganti simil-osteoclastiche (UCOGC).

Una volta raccolto un numero significativo di UCOGC (23 pancreatici e 5 extra-pancreatici), sono state registrate le informazioni clinico-patologiche. E' stata quindi condotta analisi molecolare con whole-exome sequencing, ed è stata studiata con immunohistochimica (ICH) l'espressione di biomarcatori legati all'immunoterapia quali PD-1, PD-L1 e CD163. Infine è stato indagato il potenziale valore prognostico dei risultati con analisi di sopravvivenza.

Lo studio clinico-patologico ha mostrato che gli UCOGC possono essere "puri" o insorgere in associazione a neoplasia differenziata (in genere PDAC). Se "puri" la prognosi è nettamente migliore. L'analisi molecolare ha chiarito definitivamente come UCOGC sia realmente una variante di PDAC, giacché condivide con esso le mutazioni nei principali geni tipicamente mutati nel PDAC stesso, quali *KRAS*, *TP53*, *SMAD4* e *CDKN2A*. Non sono stati trovati geni tipici di UCOGC, sebbene da segnalare sia il reperto del gene *SERPINA3*, noto driver in neoplasie ginecologiche ma mai segnalato nel carcinoma del pancreas, che è stato trovato mutato (identica mutazione) in due casi di UCOGC. L'ICH ha indicato come PD-L1 sia espresso maggiormente nei casi associati a PDAC rispetto a UCOGC puri, e che l'espressione di PD-L1 ha un valore prognostico negativo. PD-1, quando espresso, era presente sui linfociti in sede peritumorale. CD163 era espresso in modo significativo e diffuso sugli istiociti in tutti i casi.

Con questa tesi di dottorato abbiamo dimostrato che la morfologia è molto importante, avendo gli UCOGC puri una miglior prognosi. Lo studio molecolare ha chiarito che UCOGC e PDAC fanno parte della stessa famiglia di tumori pancreatici, poichè UCOGC presenta mutazioni nei 4 geni driver di PDAC, quali *KRAS*, *TP53*, *SMAD4* e *CDKN2A*. L'ICH per PD-1, PD-L1 e CD163 ha chiarito che UCOGC può rappresentare un bersaglio potenziale per le nuove strategie di immunoterapia.

ABSTRACT

Pancreatic carcinoma is a malignant neoplasm with a high mortality rate. The study of conventional pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and its variants can improve the comprehension of its biology. The aim of this thesis is a comprehensive study of a PDAC variant, the undifferentiated carcinoma of the pancreas with osteoclast-like giant cells (UCOGC).

After collecting a significant number of UCOGC (23 pancreatic and 5 extra-pancreatic), we recorded clinic-pathological data. Then we performed whole-exome sequencing for comprehensive molecular analysis. Tumor samples were also tested with immunohistochemistry (IHC) for immunotherapy biomarkers PD-1, PD-L1 and CD163. The prognostic role of clinic-pathological, molecular and IHC results was evaluated with ad-hoc survival analysis.

We found that UCOGC could present in a “pure” form or associated with a differentiated neoplasia (usually PDAC). The “pure” form of UCOGC has a better prognosis. At molecular level, UCOGC shares the same somatic mutations with PDAC, involving the four most important driver genes *KRAS*, *TP53*, *SMAD4* and *CDKN2A*. This demonstrates definitively that UCOGC is a real PDAC variant. No typical UCOGC genes were found but, interestingly, *SERPINA3*, a driver gene in some gynecological malignancies never found in association with pancreatic carcinoma, presented the same mutation in two distinct UCOGC. The IHC for the immunological targets revealed that PD-L1 is more expressed in UCOGC associated with PDAC; its expression has a negative prognostic role. PD-1, if present, was expressed by peri-tumor lymphocytes. CD163 was significantly and diffusely expressed in all the histiocytes of all UCOGC.

We demonstrated an important role of morphology, having the “pure” form a better prognosis. Molecular results have clarified that UCOGC is a PDAC variant. IHC of PD-1, PD-L1 and CD163 showed that UCOGC may represent a potential target for new immunotherapy strategies. In particular, data concerning PD-L1 appear very promising, demonstrating its expression in above all cases associated with PDAC and its negative prognostic value. Furthermore, CD163 is expressed diffusely and strongly in all cases, with possible implications for future immunotherapies.

INDICE

INTRODUZIONE	Pag.6
MATERIALI E METODI	Pag.12
RISULTATI	Pag.15
DISCUSSIONE	Pag.19
CONCLUSIONI	Pag.22
BILBIOGRAFIA	Pag.23
LEGENDA DELLE FIGURE	Pag.27
FIGURE E TABELLE	Pag.28

INTRODUZIONE

Nella classificazione dei tumori gastrointestinali stilata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e correntemente in uso, i carcinomi indifferenziati del pancreas con cellule giganti simil-osteoclastiche (UCOGC) sono classificati come una probabile variante dell'adenocarcinoma duttale convenzionale (PDAC) [1]. Si tratta di neoplasie rare che, dal punto di vista morfologico, risultano composte da cellule neoplastiche mono-nucleate pleomorfe, a forma variabile ma prevalentemente fusata. Sono inoltre presenti altre cellule, non neoplastiche, più grandi e multinucleate, morfologicamente del tutto simili agli osteoclasti, da cui il nome di questa peculiare variante patologica. Inoltre è presente anche un terzo tipo di cellule, monomorfe e mono-nucleate, e di natura istiocitaria. Questo tipo di carcinoma non è tipico del pancreas, anche se il pancreas rappresenta la sede più comune; può, infatti, insorgere in altri organi fra cui i più comuni sono mammella, vescica e polmone [1-3].

L'età media dei pazienti con UCOGC pancreatico è di circa 60 anni, con una lieve prevalenza nelle donne [1-3]. Clinicamente, sulla base della sede tumorale, essi possono causare ittero se interessano la testa del pancreas, e invariabilmente dolore addominale, perdita di peso, nausea e vomito per qualsiasi settore pancreatico; raramente si presentano asintomatici al momento della diagnosi [2]. Recenti studi, tra cui la classificazione OMS stessa, indicano che la prognosi è infausta, con una sopravvivenza media di soli 12 mesi [1]. Un recente studio indica che tuttavia vi sarebbe per alcuni pazienti una prognosi più favorevole, con sopravvivenza talora molto maggiore rispetto al PDAC [4].

Dal punto di vista macroscopico, questi tumori formano solitamente masse grandi: in media l'asse maggiore è di circa 10 cm. Sulla sezione di taglio appaiono solidi e biancastri, specialmente se associati con un PDAC, ma sono altresì costanti delle aree giallo-brunastre, talora cistiche e di aspetto necrotico-emorragico. Sono inoltre state descritte, nel contesto di tali lesioni, delle zone calcifiche, talora con deposizione di matrice osteoide. La sede prevalente è la testa del pancreas (superiore al 50% dei casi descritti), mentre il resto è equamente diviso fra corpo e coda.

Dal punto di vista microscopico (**Figura 1**), in un abbondante citoplasma eosinofilo, le cellule giganti simil-osteoclastiche comprendono almeno 10 nuclei piccoli ed uniformi. Tali cellule sono spesso disposte attorno alle aree necrotico-emorragiche, e possono presentare attività fagocitica. Come risultato, esse possono contenere emosiderina ed anche detriti di cellule neoplastiche. In aggiunta, le cellule giganti simil-osteoclastiche sono state anche descritte oltre che nel tumore primitivo, anche nelle metastasi di UCOGC [1-3]. Dall'altro lato, le cellule atipiche mononucleate sono elementi talora rotondeggianti ma prevalentemente fusati; essi possiedono uno scarso citoplasma eosinofilo e possono essere caratterizzati da un marcato pleomorfismo e da ipercromasia nucleare [1-3]. Le mitosi sono comuni e possono essere anche bizzarre. Accanto a questi due tipi cellulari vi sono cellule mononucleate non atipiche, di derivazione istiocitaria e sovente con nucleo piccolo, rotondo o reniforme.

Gli UCOGC del pancreas possono formare matrice osteoide (**Figura 1**) e, una percentuale non trascurabile di essi (circa il 30-40%) insorge in associazione con adenocarcinoma in situ (PanIn3) o invasivo, o con una neoplasia cistica mucinosa [1-6]. Se presente una neoplasia differenziata in associazione con UCOGC, generalmente si assiste ad una netta demarcazione fra questi due tumori; gli osteoclasti, inoltre, sono sempre confinati nell'area del carcinoma indifferenziato [1-3]. In caso di metastasi, esse consistono di elementi indifferenziati talora commisti a cellule giganti simil-osteoclastiche e, nel caso di PDAC associato, possono trovarsi anche ghiandole.

Per ciò che concerne il profilo immunoistochimico noto, la maggior parte degli elementi neoplastici mononucleati degli UCOGC risulta positiva sia alle citocheratine che alla vimentina e p53, sebbene in alcuni casi sia stata riportata una totale negatività per le cheratine [7-12]. Allo stesso tempo, le cellule giganti simil-osteoclastiche esprimono pressoché costantemente CD45, CD68, vimentina e alfa-1-antichimotripsina, ma risultano negative alle cheratine e a p53 [9-12]. Inoltre esse esprimono catepsina-K, suggerendo una reale differenziazione osteoclastica, e osteonectina nelle aree di formazione di osteoide. Le cellule istiocitarie sono CD68 positive [8-12].

Grazie a recenti indagini di biologia molecolare è stata recentemente chiarita, seppur ancora in modo superficiale, la natura di questi tumori. In circa il 90% degli UCOCGC pancreatici studiati, infatti, è stata descritta una mutazione puntiforme attivante nel codone 12 dell'oncogene KRAS. Tale mutazione è stata attribuita alla controparte mono-nucleata atipica [13-18]; la rilevazione della stessa a carico delle cellule simil-osteoclastiche, infatti, è stata attribuita alle capacità fagocitiche di tali cellule piuttosto che alla loro natura intrinsecamente maligna [13-18]. Inoltre, in caso di neoplasie epiteliali associate e in particolare di PDAC, le stesse mutazioni di KRAS venivano condivise tra UCOCGC e tumore associato [13].

Sulla base del quadro morfo-fenotipico e molecolare, quindi, gli UCOCGC pancreatici sono considerati quali neoplasie maligne di natura epiteliale, in cui vi è una commistione degli elementi neoplastici con cellule giganti simil-osteoclastiche di derivazione istiocitaria ed istiociti non osteoclastici. E' stato ipotizzato, attraverso l'uso di modelli in vitro, che le cellule epiteliali neoplastiche possano produrre citochine in grado di richiamare macrofagi dal torrente circolatorio e stimolarne la differenziazione in osteoclasti [19]; negli UCOCGC del pancreas, tuttavia, così come negli UCOCGC degli altri distretti dell'uomo, tali ipotesi rimangono tuttora inesplorate.

Il trattamento di scelta rimane la resezione radicale chirurgica, che tuttavia è possibile solo in casi selezionati. L'efficacia della radioterapia e della chemioterapia non è stata ancora definitivamente stabilita, e l'analisi molecolare potrebbe avere delle implicazioni importanti anche per la stratificazione prognostica e terapeutica dei pazienti con UCOCGC.

Al fine di chiarire l'assetto molecolare di tali neoplasie, ci affideremo a tecniche dello studio del DNA indicate con il nome generale di *next-generation sequencing* o *high-throughput sequencing*, cioè sequenziamento ad alta resa. Tali tecniche consentono di studiare un'elevatissima quantità di sequenze, anche di pazienti diversi in parallelo, in brevissimo tempo e a costi relativamente contenuti. L'analisi di *high-throughput sequencing* a cui ci affideremo è il cosiddetto *Whole-exome sequencing*, termine che identifica il sequenziamento dell'intera regione codificante del genoma. Anche se la regione codificante rappresenta soltanto l'1%

di tutto il genoma, si stima che fino all'85% di tutte le mutazioni patogene siano contenute in questa regione [20]. Si tratta quindi della metodica elettiva per la ricerca di nuovi geni mutati in una determinata malattia.

Altro argomento importante nello studio delle neoplasie è oggi rappresentato dall'analisi di biomarcatori legati all'immunoterapia. Lo studio dei marcatori bersaglio di immunoterapia prevede come primo passaggio fondamentale l'analisi immunohistochimica per PD-1, PD-L1 e CD137 [21-32]. Negli ultimi anni, infatti, la ricerca si è concentrata nell'identificazione di nuove strategie per combattere il cancro ed uno dei maggiori successi in questo ambito è rappresentato proprio dall'immunoterapia. Le cellule tumorali sono in grado di trovare diversi meccanismi con cui eludere la risposta immunologica antitumorale dell'ospite: una delle principali di esse è "silenziare" la funzione dei linfociti T. A differenza delle tradizionali chemioterapie, ma anche della terapia biologica, l'immunoterapia rappresenta una strategia "rivoluzionaria", poiché si propone di potenziare la risposta dell'ospite contro la neoplasia.

Uno dei checkpoint immunologici nel cross-talk tra il microambiente e le cellule tumorali che è stato maggiormente studiato e che ha portato alla formulazione di terapie innovative è l'asse tra il "Programmed cell death 1" (PD-1) e il suo ligando "Programmed cell death 1 ligand" (PD-L1) (via del PD-1/PD-L1) [21-29]. PD-1, anche conosciuto come CD279, è stato identificato per la prima volta nel 1992 come una glicoproteina appartenente alla famiglia delle immunoglobuline, espressa sulla superficie delle cellule T attivate [21]. I suoi ligandi, PD-L1 e PD-L2, sono normalmente espressi sulla superficie delle cellule dendritiche e dei macrofagi. Una volta attivata, questa pathway inibisce o limita lo sviluppo della risposta immunitaria mediata dalle cellule T. Infatti, quando PD-1 si lega a PD-L1 trasmette all'interno della cellula T un segnale inibitorio che riduce la produzione di citochine e la proliferazione cellulare. L'interazione tra PD1 e PD-L1 assicura quindi che il sistema immunitario sia attivato solo nei momenti appropriati, in modo da minimizzare la possibilità di processi infiammatori autoimmuni [22].

E' stato dimostrato che alcune cellule neoplastiche sfruttano questo stesso "check-point" immunitario per eludere e inibire la risposta immunitaria contro il cancro. L'espressione di PD-L1 può essere indotta da alterazioni genetiche durante il

processo di oncogenesi, come la perdita di PTEN nei glioblastomi o l'attivazione costitutiva della via di segnale di ALK nelle neoplasie polmonari e nei linfomi, o per amplificazione del gene che lo codifica [23]. Inoltre l'espressione di PD-L1 può essere indotta attraverso l'interferone gamma: esso può stimolare la pathway del PD-L1, silenziando così anche la risposta immunitaria dell'ospite contro la neoplasia [24].

L'espressione di PD-L1 da parte delle cellule neoplastiche rappresenta pertanto il target ideale per l'immunoterapia. Recentemente, anticorpi monoclonali anti-PD-L1/PD-1 sono stati approvati dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) per il trattamento del melanoma, del carcinoma non a piccole cellule del polmone e del carcinoma uroteliale in stadio metastatico.

L'espressione di PD-L1 sulle cellule neoplastiche è solitamente testata mediante analisi immunohistochimica su tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina. Almeno sei differenti saggi immunohistochimici per la determinazione di PD-L1 sono stati messi a punto nei trials clinici (essi sono: Dako 28-8, Dako 22C3, Ventana SP142, Ventana SP263, Dako 73-10, Cell Signaling E1L3N). Ciascuno di questi sistemi utilizza anticorpi che riconoscono un epitopo differente della proteina e la valutazione dei risultati positivi o negativi è pertanto anch'essa diversa a seconda dell'anticorpo usato [25]. Recenti studi hanno inoltre dimostrato la presenza dell'asse PD-1/PD-L1 nel carcinoma del pancreas [26], indicando anche una possibile correlazione tra espressione di PD-L1 e peggioramento della prognosi, ma mancano ancora dei dati affidabili dell'espressione e del ruolo di tale asse nel carcinoma del pancreas e soprattutto negli UCOGC.

Altro importante nuovo argomento legato all'immunoterapia è rappresentato dai macrofagi-associati al tumore (TAM). In particolare, negli UCOGC sappiamo già che i macrofagi sono una parte costitutiva del tumore, ma ad oggi non si sa che ruolo questi ricoprono nella biologia di UCOGC.

Grazie alle osservazioni di Virchow, è noto già da tempo che i macrofagi costituiscono parte degli elementi cellulari dell'infiltrato infiammatorio associato alle neoplasie [27]. I macrofagi, in base al loro meccanismo d'azione, sono suddivisi in due sottopopolazioni: i macrofagi M1 che possiedono attività inibitorie sulla proliferazione cellulare e fagocitaria, ad esempio nei confronti dei

patogeni esogeni, e i macrofagi M2 che stimolano la riparazione e la crescita tissutale mediante la produzione di fattori di crescita come ornitina, VEGF, EGF e TGF β e che si trovano per esempio nelle ferite non infette [28]. Questi ultimi esprimono elevate quantità del recettore “scavenger” CD163 e possono, pertanto, essere tipizzati mediante analisi immunohistochimica con l’anticorpo anti-CD163. La maggior parte dei macrofagi associati alle neoplasie è di tipo M2: il microambiente tumorale produce segnali che inibiscono la differenziazione dei monociti in senso M1 e promuovono, attraverso la via dell’immunità innata, l’attività dei macrofagi M2, che a loro volta, con la produzione di fattori di crescita, favoriscono la sopravvivenza e lo sviluppo tumorale [29]. Mentre i macrofagi M1 stimolano i linfociti T naïve a differenziare in senso Th1/citotossico, i macrofagi M2 condizionano la differenziazione in senso Th2/Treg e quindi inibiscono l’attività antitumorale [30].

Il PDAC è caratterizzato dalla presenza di abbondante stroma, che contiene in alcuni casi un significativo numero di macrofagi di tipo M2, che possono promuovere il processo di cancerogenesi [31,32]. Nuovi approcci immunoterapici agiscono convertendo i macrofagi M2 in macrofagi M1, e dovrebbero essere valutati in neoplasie ricche in macrofagi M2. Non vi sono tuttavia dati riguardanti i macrofagi M2 in UCOGC.

Al fine di un corretto inquadramento dei potenziali target di immunoterapia quindi, la parte finale di questa tesi vedrà l’analisi immunohistochimica per PD-1, PD-L1 e CD163.

Scopi di questa tesi di dottorato sono quindi: 1) la raccolta di una casistica numericamente importante sfruttando una collaborazione multicentrica; 2) la revisione istopatologica dei casi, raccogliendo tutti i dati, anche clinici, di ognuno, 3) lo studio delle caratteristiche cliniche dei pazienti con UCOGC (sintomi, sopravvivenza globale), 4) lo studio molecolare delle cellule neoplastiche al fine di chiarirne l’esatta origine e di individuare eventuali mutazioni tipiche di questo tipo di tumori, 5) lo studio del microambiente tumorale e di markers possibili bersaglio di immunoterapia, 6) il confronto di tutti i parametri ottenuti con i dati clinici alla ricerca di moderatori morfologici o molecolari in grado di stratificare la prognosi dei pazienti con UCOGC.

MATERIALI E METODI

Criteri di ricerca e collezione dei casi

Per questo studio sono stati ricercati nei database patologici (Armonia, PDS) e chirurgici (Gecos, EPIC) dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona e della Johns Hopkins University di Baltimora tutti i carcinomi del pancreas con cellule giganti o anaplastici o indifferenziati. Per la parte finale di analisi immunistochimica per target di immunoterapia abbiamo ampliato la raccolta di casi reclutandone anche dall'Unità di Patologia dell'Università Paris Descartes di Parigi, dall'Unità di Anatomia Patologica e Medicina di Laboratorio dell'Ospedale Universitario di Indianapolis e dall'Unità di Anatomia e Istologia Patologica dell'Ospedale Santa Chiara di Trento.

Revisione istopatologica e raccolta dei dati clinici

Per tutti i casi sono stati rivisti i preparati istopatologici alla luce della nuova classificazione OMS del 2010 e della classificazione TNM; sono stati inoltre raccolti tutti i parametri clinici disponibili. I parametri registrati sono stati i seguenti: età e genere del paziente, sintomi, caratteristiche macroscopiche generali, sede del tumore, dimensioni, presenza di crescita tumorale intraduttale, deposizione di matrice ossea, presenza di PanIn o di tumore invasivo associato, pTNM, invasione vascolare, infiltrazione peri-endoneurale, markers immunoistochimici testati nell'iter diagnostico, tipo di intervento chirurgico ed eventuale esecuzione di chemio-radioterapia neo-adiuvante. Inoltre è stato registrato il numero dell'incluso in paraffina più rappresentativo per ogni caso, sia di tumore (carcinoma indifferenziato e, ove presente, neoplasia associata) che di tessuto normale.

Analisi molecolare

Deparaffinizzazione ed estrazione del DNA

Al fine di rendere fruibili i casi per analisi genetica, si è proceduto alla microdissezione manuale al microscopio degli stessi. Sono state microdissecate

manualmente le aree di tumore indifferenziato (con una cellularità neoplastica stimata almeno nel 50%), di tessuto normale, e, ove presente, di neoplasia associata. Per la deparaffinizzazione ed estrazione del DNA sono stati seguiti i protocolli *QIAamp* (QIAGEN Protocol and Supplementary Protocol, QIAGEN, Germantown, MD, USA) con l'uso del kit per la deparaffinizzazione *DNA FFPE Tissue kit and Deparaffinization Solution* (QIAGEN, Germantown, MD, USA). Per quantificare il DNA ottenuto, si è provveduto ad utilizzare il metodo fluorimetrico con Qubit (Life Technologies, San Francisco, CA, USA).

Whole-exome sequencing e analisi dei dati

I passaggi di costruzione delle librerie, exome capture, next-generation sequencing, e di analisi bioinformatica dei tumori sono stati condotti presso la Personal Genome Diagnostics (Baltimora, MD, USA). Brevemente, il DNA dal tumore e dal tessuto normale è stato frammentato ed è stata sottoposta a PCR (polymerase chain reaction). Usando il metodo Agilent SureSelect seguendo il protocollo della ditta produttrice (Agilent, Santa Clara, CA, USA), le regioni esoniche sono state catturate in soluzione. Quindi, usando il HiSeq2500 next-generation sequencing instrument (Illumina, San Diego, CA, USA), è stato condotto il sequenziamento. Il confronto di dati fra tumore e tessuto normale, per identificare le mutazioni somatiche, è stato condotto con il software Illumina CASAVA (v1.8). Sono state quindi identificate le mutazioni somatiche eliminando i possibili artefatti da sequenziamento/allineamento. Le mutazioni somatiche identificate saranno studiate anche con analisi di pathway, alla ricerca di possibili correlazioni fra i geni trovati mutati in UCOGC e i geni (o le pathway) mutate nell'adenocarcinoma convenzionale o in altro tumori. Saranno utilizzati specifici software per tale analisi: g:Profiler (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>) e Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>).

PD-1, PD-L1 e CD163

L'analisi immunohistochimica per PD-1 è stata condotta con un anticorpo della compagnia ABCAM, il clone è chiamato NAT, il pH di incubazione è 9, la diluizione è stata 1:100, seguendo il protocollo della compagnia stessa.

L'analisi immunohistochimica per PD-L1 è stata condotta con un anticorpo della compagnia Cell Signaling, il clone è chiamato E1L3N, il pH di incubazione è 8, la diluizione è stata 1:500, seguendo il protocollo della compagnia stessa.

L'analisi immunohistochimica per CD163 è stata condotta con un anticorpo della compagnia Novocastra, il clone è chiamato 10D, il pH di incubazione è 8, la diluizione è stata 1:200, seguendo il protocollo della compagnia stessa.

L'analisi immunohistochimica è stata condotta su sezioni di 4 micrometri, utilizzando il sistema standard basato su polimero e perossidasi. Dopo il recupero dell'antigene indotto da calore (piastra riscaldata per 15 minuti) si procedeva a contro-colorazione con ematossilina per 5 minuti, al fine di evidenziare lievemente i nuclei cellulari.

Tutti i campioni sono stati processati con il sistema "Bond polymer Refine" in uno strumento automatizzato (Vision-Biosystem; Leica, Milan, Italy). Sezioni incubate senza l'anticorpo sono state utilizzate come controlli negativi.

Per questa parte immunohistochimica sono stati aggiunti attraverso le suddette collaborazioni multicentriche ulteriori 7 casi di UCOGC pancreatici ad anche 5 casi di UCOGC non pancreatico come mini-coorte esplorativa di questa neoplasia al di fuori del pancreas. Per i PD-1, PD-1 e CD163 è stata infine condotta una analisi di sopravvivenza al fine di identificare un loro possibile impatto sulla prognosi di UCOGC.

RISULTATI

Selezione dei casi

Attraverso il metodo di selezione prima indicato, sono stati identificati 106 casi dei quali, attraverso la lettura del referto anatomico-patologico e/o la revisione dei preparati istopatologici se vi erano dei dubbi, sono stati infine selezionati 22 carcinomi indifferenziati del pancreas con cellule giganti simil-osteoclastiche.

Parametri clinico-patologici ed analisi di sopravvivenza

I principali parametri clinici ed istopatologici dei pazienti oggetto dello studio sono riassunti nella **Tabella 1**. Vi sono 12 pazienti femmine e 10 maschi, con un'età media di 66 anni. La sede tumorale prevalente è la testa del pancreas (77,3%). L'ittero con prurito rappresenta il sintomo costante per le neoplasie cefalopancreatiche; per le neoplasie di corpo e coda il sintomo principale è il dolore addominale. Quattro pazienti avevano inoltre eseguito chemioterapia neoadiuvante; tali pazienti sono stati esclusi dall'analisi genetica per le proprietà mutagene note dei chemioterapici, che avrebbero potuto alterare i risultati. Nove casi su 22 (40%) erano dati da UCOGC puri, cioè UCOGC non associati ad altre neoplasie, mentre 13 (60%) erano associati a neoplasie epiteliali, rappresentate in genere da adenocarcinoma duttale convenzionale o da neoplasia mucinose con aree di infiltrazione stromale. L'invasione del sistema duttale, dei vasi e dei nervi erano caratteristiche molto comuni. I dati di sopravvivenza erano disponibili per 17 pazienti, uno dei quali, per morte intraoperatoria, è stato escluso dall'analisi di sopravvivenza. Nei 16 casi rimanenti, la sopravvivenza globale (OS) media era di 20 mesi. Si assisteva al contempo ad una netta demarcazione fra due sottogruppi, in particolare tra UCOGC puri e UCOGC associati a neoplasia epiteliali differenziate. Infatti, la OS media dei puri era di 36 mesi (IQR: 16–72 mesi), mentre quella di UCOGC associati a neoplasie epiteliali era di 15 mesi (IQR: 9–32 mesi). Tale differenza era statisticamente significativa (log-rank test: $p=0.04$), ed è anche mostrata nella curva di Kaplan-Meier (**Figura 2**). Dopo aver aggiustato con analisi multivariabile per età e sesso, il gruppo di UCOGC con associato neoplasia epiteliale aveva un rischio di morte aumentato di circa 5 volte

rispetto a UCOGC puri [Analisi di regressione di Cox, HR=4.98 (95% CI 1.00–24.82; p=0.05)].

Analisi molecolare

Deparaffinizzazione ed estrazione del DNA

Sono stati inviati a PDG per l'analisi genetica circa 1000 ng di DNA estratto per caso, sia di tumore che di tessuto normale dello stesso paziente. L'analisi genetica è stata compiuta su un totale di 8 casi. Infatti, dopo esclusione di 4 casi per chemioterapia neo-adiuvante e di 1 per insufficiente quantità di tessuto tumorale, altri 8 casi sono stati esclusi perché il DNA estratto non si era reso utilizzabile per sequenziamento. Si trattava di casi con più di 20 anni, archiviati in paraffina e la presenza di un DNA danneggiato o troppo frammentato per consentire il sequencing va attribuita anche alla loro lunga conservazione in paraffina.

Whole-exome sequencing ed analisi dei dati

Whole-exome sequencing è stato condotto su 8 casi. Una lista della mutazioni verosimilmente di tipo driver, che include noti geni driver e geni alterati in più di un UCOGC, è fornita nella **Tabella 2**. Il numero medio di mutazioni somatiche per tumore era 27. Gli UCOGC analizzati avevano frequenti mutazioni somatiche nei 4 geni driver principalmente correlati dell'adenocarcinoma duttale convenzionale, e cioè l'oncogene *KRAS* e gli onco-soppressori *TP53*, *SMAD4* e *CDKN2A* (Tabella 2). Infatti, tutti gli 8 casi sequenziati avevano mutazioni in *KRAS* (regione hotspot del codone 12), 7 degli 8 casi sequenziati presentava mutazione in *TP53*, due in *CDKN2A* e uno in *SMAD4*. Oltre a questi ben noti driver dell'adenocarcinoma duttale, venivano identificate mutazioni in altri geni noti come driver in altri tipi di cancro, come *PTEN* e *BAP1*. Vi era poi un piccolo numero di geni mutato in più di un UCOGC (Tabella 2). *SERPINA3* aveva una mutazione missense non-sinonima sullo stesso residuo aminoacidico in due casi; altri geni con mutazioni non-sinonime in più di un UCOGC erano *MAGEB4* (due tumori), *GLI3* (due tumori), *MEGF8* (due tumori), e *TTN* (tre tumori). Di questi solo *GLI3* è noto per essere associato addl'adenocarcinoma duttale del pancreas di tipo convenzionale, facendo parte di una pathway (Hedgehog signaling pathway), nota come fra le principali in questo tumore. L'analisi di pathway condotta con

g:Profiler (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>) e Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>) non ha rivelato altre possibili correlazioni con l'adenocarcinoma duttale convenzionale negli altri geni mutati in UCOGC.

PD-1, PD-L1 e CD163

I risultati dell'analisi immunohistochimica per PD-1, PD-L1 e CD163 sono riassunti nella **Tabella 3** e rappresentati **nella Figura 3**. Lo studio immunohistochimico è stato possibile su un totale di 23 UCOGC pancreatici e su 5 UCOGC non pancreatici.

UCOGC pancreatici

Per PD-L1, vi era espressione in 4 su 10 UCOGC puri, e in 11 su 13 UCOGC associati a neoplasia. La differenza di espressione di PD-L1 in UCOGC puri vs. UCOGC associati a neoplasia era statisticamente significativa, con UCOGC associati a neoplasia che presentavano una netta prevalenza di espressione (40% vs 84.6%, test di Fisher: $p=0.0393$).

Per PD-1 non vi erano differenze di espressione tra UCOGC puri o non puri. 17 casi su 23 presentavano una certa espressione. Da notare che solo 2 casi mostravano rare cellule PD-1 positive all'interno della lesione, a conferma che in UCOGC non vi sono linfociti (o se vi sono, sono rarissimi). Quando vi erano linfociti PD-1 positivi, questi erano infatti posti prettamente in sede peritumorale; in presenza di positività per PD-1 in UCOGC con neoplasia associata, in 7 di 9 casi vi erano linfociti PD-1 positivi solo nella zona riferibile ad adenocarcinoma convenzionale.

Per CD163, vi era un'intensa e diffusa positività all'interno di UCOGC, in tutti i casi testati (100%). Se vi era una neoplasia associata, questa esibiva anch'essa macrofagi CD163 positivi, ma in numero molto minore rispetto alla zona riferibile ad UCOGC. Da un punto di vista numerico, vi erano sempre più di 50 macrofagi CD163-positivi per ogni campo a forte ingrandimento in UCOGC, e in numero da 5 a 10 nelle zone riferibili a neoplasia associata.

UCOGC non pancreatici

PD-L1 era espresso in 3 casi su 5 e PD-1 in 4 casi su 5; CD163 era espresso in tutti i casi con le medesime modalità osservate per UCOGC pancreatico.

Analisi di sopravvivenza

Per i biomarcatori legati all'immunoterapia, l'unico per cui si siano ottenuti risultati significativi di correlazione con la prognosi era PD-L1. Infatti, i casi che esprimono PD-L1 hanno un rischio di mortalità globale aumentato di oltre tre volte rispetto ai casi PD-L1 negativi (**Figura 4**: curva di Kaplan-Meier; analisi di regressione di Cox: HR: 3.268. 95%CI: 0.631-16,929).

DISCUSSIONE

In questa tesi di dottorato viene fatta luce sulle principali caratteristiche clinico-patologiche di questi tumori rari, chiarendone anche il profilo molecolare e con un approfondimento anche sull'espressione di biomarcatori legati all'immunoterapia. La raccolta di una casistica relativamente ampia, soprattutto in considerazione della rarità di questi tumori, ci ha permesso di capirne meglio gli aspetti morfologici e di avere un maggior impatto scientifico per quanto descritto.

Le prime considerazioni generali riguardano i caratteri istopatologici. Rispetto a quanto noto in letteratura, questo lavoro si pone in linea con i dati pre-esistenti, confermando tra gli altri la predilezione di dette neoplasie per la testa del pancreas, l'elevato tropismo per l'invasione dell'albero duttale e la frequente associazione con adenocarcinoma duttale di tipo convenzionale [1-3].

Dal punto di vista clinico, quest'ultima associazione appare quella più significativa. Infatti la sopravvivenza risulta essere molto maggiore in pazienti con UCOGC puro rispetto a quelli con UCOGC associato ad adenocarcinoma duttale o ad altra neoplasia con componente infiltrante. In questi ultimi casi la prognosi appare infatti dettata dalla neoplasia più aggressiva, mentre in caso di UCOGC puro si osserva una minore malignità, con stadi tumorali più bassi ed una minore tendenza alla metastatizzazione linfonodale. Nel caso di UCOGC puri potrebbe essere anche una più efficace risposta immunitaria dell'ospite a contenere la crescita tumorale, cosa invece molto più difficile in caso di adenocarcinoma duttale convenzionale.

Lo studio genetico di UCOGC ci ha consentito di chiarire in modo definitivo come essi rappresentino realmente una variante dell'adenocarcinoma duttale convenzionale. Alcuni studi in letteratura avevano già dimostrato la condivisione di identiche mutazioni fra le due controparti; si tratta tuttavia di studi su singolo caso e con analisi genetica su singola porzione di singolo gene, come ad esempio la dimostrazione di identica mutazione nel codone 12 del gene *KRAS* [13,14]. Un altro studio, dimostrando l'associazione fra UCOGC e sindrome FAMMM (Familial Atypical Multiple Mole Melanoma Syndrome), già nota per la sua associazione con l'adenocarcinoma duttale convenzionale, aveva avvalorato

questa ipotesi [33]. Con il whole-exome sequencing, in questo studio abbiamo dimostrato che in UCOGC predominano le mutazioni somatiche a carico di geni già noti quali principali driver del duttale, quali *KRAS*, *TP53*, *SMAD4* e *CDKN2A*. Inoltre, al di là del gene *SERPINA3*, noto driver ad esempio per il carcinoma dell'endometrio [34] ma non descritto per il carcinoma del pancreas (qui presente mutato con mutazione identica in 2 casi di 8), e del gene *GLI3* (anche qui 2 casi su 8, collegato al duttale anche se non direttamente ma perché facente parte della hedgehog pathway [35]), non sono emersi altri geni potenziali che verosimilmente possano rappresentare dei driver diversi dal duttale convenzionale e tipici solo di UCOGC. Oltre a chiarire che UCOGC rappresentano una reale variante dell'adenocarcinoma duttale convenzionale, quindi, l'analisi genetica ha anche dimostrato che non sono le mutazioni somatiche quelle che possono spiegare il fenotipo unico di queste neoplasie, che morfologicamente appaiono così diverse dal duttale di cui tuttavia ne rappresentano un sottoinsieme. Per altre varianti di adenocarcinoma duttale, al contrario, sono state evidenziate delle mutazioni peculiari specifiche della variante stessa, come ad esempio il gene *UPF1* nella variante adenosquamosa o il gene *GNAS* nella variante di tipo colloide [1-3,36]. In UCOGC, invece, non sono emerse significative e nuove peculiarità genetiche che siano condivise nella maggior parte dei casi.

L'analisi immunohistochimica per PD-1, PD-L1 e CD163 ha evidenziato una diffusa espressione di PD-L1, soprattutto nei casi associati ad adenocarcinoma duttale convenzionale. Sia nello stesso adenocarcinoma duttale che in altri tipi di cancro, l'espressione di PD-L1 è stata correlata a peggior prognosi [37,38]. L'analisi di sopravvivenza condotta sulla nostra coorte conferma il dato prognostico peggiorativo legato all'espressione di PD-L1. I nostri risultati sottolineano come gli UCOGC, sia puri ma soprattutto se associati ad adenocarcinoma duttale convenzionale, andrebbero indagati per l'espressione di PD-L1. In caso di espressione questi casi potrebbero infatti rappresentare un altro target per le nuove immunoterapie mirate a inibire la pathway del PD-L1.

L'analisi del PD-1 ha chiarito come in UCOGC non vi siano in genere linfociti: le cellule infiammatorie in questo tipo di neoplasia sono quasi esclusivamente della linea istiocitaria. Quando i linfociti sono presenti, sono posti in sede peritumorale

o nell'area di pertinenza di adenocarcinoma associato. In presenza di quest'ultimo, sono stati repertati linfociti PD-1 positivi. Anche se la loro espressione non ha dato correlazioni prognostiche, essa ha confermato come presente in tali casi la via del PD-1/PD-L1.

Di notevole interesse invece è stato anche chiarire come negli UCOGC, noti per essere costituiti in gran parte da macrofagi intimamente frammisti a cellule tumorali e cellule simil-osteoclastiche, i macrofagi siano del tipo M2, CD163-positivi. Si tratta di macrofagi che favoriscono la crescita tumorale attraverso la produzione di una serie di citochine, con azioni pro-angiogenetiche ed anti-apoptotiche. Essendo UCOGC così ricchi in tali macrofagi M2, ed esistendo già dei primi studi volti a testare terapie che blocchino l'azione dei macrofagi M2 [39], il nostro lavoro pone in luce gli UCOGC stessi come potenziali candidati per tali terapie, soprattutto in casi non resecabili.

PD-L1, PD-1 e CD163, seppur in differente misura, risultano espressi anche in UCOGC non pancreatici, e quindi saranno utili ulteriori studi su tali neoplasie anche al di fuori del pancreas per chiarire l'effettiva possibilità di strategie di immunoterapia.

CONCLUSIONI

Concludendo, in questa tesi di dottorato è stato studiato un sottotipo raro di carcinoma pancreatico. Lo studio istopatologico di UCOGC ha dimostrato importanti caratteristiche morfologiche di tali neoplasie che hanno un forte impatto sulla prognosi (UCOGC “puro” vs. UCOGC associato ad adenocarcinoma). Lo studio molecolare ha definitivamente chiarito come UCOGC sia una reale variante dell’adenocarcinoma duttale convenzionale, esibendo un profilo molecolare del tutto simile, con solo rari geni (es.: *SERPINA3*) potenzialmente specifici per tale variante. Infine, lo studio di potenziali bersagli per l’immunoterapia ha evidenziato come in tali neoplasie vi sia una diffusa espressione di PD-L1 (soprattutto se UCOGC è associato ad adenocarcinoma duttale convenzionale) e di CD163, e quindi tali rare neoplasie rappresentano dei potenziali target per le nuove strategie immunoterapeutiche.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Bosman FT, Carneiro F, Hruban HR, et al. WHO classification of tumours of the digestive system. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer; 4th ed. Lyon : IARC Press, 2010.
- [2] Hruban RH, Pitman MB, Klimstra DS. Tumors of the pancreas, AFIP atlas of tumor pathology. Fourth series ; fasc. 6, Washington, D.C, USA: American Registry of Pathology in collaboration with the Armed Forces Institute of Pathology, 2007.
- [3] Luchini C, Capelli P, Scarpa A. Pancreatic ductal adenocarcinoma and its variants. *Surg Pathol Clin* 2016; 9:547-60.
- [4] Muraki T, Reid MD, Basturk O, et al. Undifferentiated Carcinoma With Osteoclastic Giant Cells of the Pancreas: Clinicopathologic Analysis of 38 Cases Highlights a More Protracted Clinical Course Than Currently Appreciated. *Am J Surg Pathol*. 2016; 40:1203-16.
- [5] Molberg KH, Heffess CS, Delgado R, et al. Undifferentiated carcinoma with osteoclast-like giant cells of the pancreas and periampullary region. *Cancer* 1998; 82:1279-87.
- [6] Berendt RC, Shnitka TK, Wiens E, et al. The osteoclast-type giant cell tumor of the pancreas. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 111:43-8.
- [7] Combs SG, Hidvegi GF, Ma Y, et al. Pleomorphic carcinoma of the pancreas with osteoclast-like giant cells expressing an epithelial-associated antigen detected by monoclonal antibody 33-3^o6. *Diagn Cytopathol* 1988; 4:316-22.
- [8] Goldberg RD, Michelassi F, Montag AG. Osteoclast-like giant cell tumor of the pancreas: immunophenotypic similarity to giant cell tumor of the bone. *Hum Pathol* 1991; 22:618-22.
- [9] Watanabe N, Miura H, Inoue H, et al. Mixed osteoclastic/pleomorphic-type giant cell tumor of the pancreas with ductal adenocarcinoma: histochemical and immunohistochemical study with review of the literature. *Pancreas* 1997; 15:201-8.

- [10] Deckard-Janatpour K, Kragel S, Teplitz RL, et al. Tumors of the pancreas with osteoclast-like and pleomorphic giant cells: an immunohistochemical and ploidy study. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122:266-72.
- [11] Dizon MA, Multhaupt HA, Paskin DL, et al. Osteoclastic giant cell tumor of the pancreas: an immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med* 1996; 120:306-9.
- [12] Gatteschi B, Saccomanno S, Bartoli FG, et al. Mixed pleomorphic-osteoclast-like tumor of the pancreas. Light microscopical, immunohistochemical, and molecular biological studies. *Int J Pancreatol* 1995; 18:169-75.
- [13] Westra WH, Sturm PJ, Drillenburger P, et al. K-ras oncogene mutations in osteoclast-like giant cell tumors of the pancreas and liver: genetic evidence to support origin from the duct epithelium. *Am J Surg Pathol* 1998; 22:1247-54.
- [14] Hoorens A, Prenzel K, Lemoine NR, et al. Undifferentiated carcinoma of the pancreas: analysis of intermediate filament profile and Ki-ras mutations provides evidence of a ductal origin. *J Pathol* 1998; 185:53-60.
- [15] Lukas Z, Dvorak K, Kroupova I, et al. Immunohistochemical and genetic analysis of osteoclastic giant cell tumor of the pancreas. *Pancreas* 2006; 32:325-9.
- [16] Sakai Y, Kupelioglu AA, Yanagisawa A. Origin of giant cells in osteoclast-like giant cell tumors of the pancreas. *Hum Pathol* 2000; 31:1223-9.
- [17] Gocke CD, Dabbs DJ, Benko FA, et al. K-ras oncogene mutations suggest a common histogenetic origin for pleomorphic giant cell tumor of the pancreas, osteoclastoma of the pancreas, and pancreatic duct adenocarcinoma. *Hum Pathol* 1997; 28:80-3.
- [18] Imai Y, Morishita S, Ikeda Y, et al. Immunohistochemical and molecular analysis of giant cell carcinoma of the pancreas: a report of three cases. *Pancreas* 1999; 18:308-15.

- [19] Hatano Y, Nakahama K, Isobe M, et al. Tumor associated osteoclast-like giant cells promote tumor growth and lymphangiogenesis by secreting vascular endothelial growth factor-C. *Biochem Biophys Res Comm* 2014; 446:149-54.
- [20] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al. Cancer genome landscapes. *Science* 2013; 339:1546-58.
- [21] Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992; 11:3887-95.
- [22] Wang L, Pino-Lagos K, de Vries VC, et al. Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:9331-6.
- [23] Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2015; 372:311-9.
- [24] Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *J Clin Invest* 2015; 125:3384-91.
- [25] Mino-Kenudson M. Immunohistochemistry for predictive biomarkers in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2017; 6:570-87.
- [26] Feng M, Xiong G, Cao Z, et al. PD-1/PD-L1 and immunotherapy for pancreatic cancer. *Cancer Lett* 2017; 407:57-65.
- [27] Cavaillon JM. The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. *J Leuk Biol* 2011; 90:413-24.
- [28] Mills CD, Kincaid K, Alt JM, et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 2000; 164:6166-73.
- [29] Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell* 2015; 27:462-72.

- [30] Shevach EM, Rosenthal AS. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. II. Role of the macrophage in the regulation of genetic control of the immune response. *J Exp Med* 1973; 138:1213-29.
- [31] Helm O, Held-Feindt J, Grage-Griebenow E, et al. Tumor-associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis. *Int J Cancer* 2014; 135:843-61.
- [32] Hu H, Hang JJ, Han T, et al. The M2 phenotype of tumor-associated macrophages in the stroma confers a poor prognosis in pancreatic cancer. *Tumour Biol* 2016; 37:8657-64.
- [33] Koorstra, Maitra A, Morsink FH, et al. Undifferentiated carcinoma with osteoclastic giant cell (UCOCCG) of the pancreas associated with the familial atypical multiple mole melanoma syndrome (FAMMM). *Am J Surg Pathol* 2008; 32:1905-9.
- [34] Yang D, Yang X, Lu H, et al. SERPINA3 promotes endometrial cancer cells growth by regulating G2/M cell cycle checkpoint and apoptosis. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7:1348-58.
- [35] Jones S, Zhang X, Parsons DW, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 2008; 321:1801-6.
- [36] Liu C, Karam R, Zhou Y, et al. The UPF1 RNA surveillance gene is commonly mutated in pancreatic adenosquamous carcinoma. *Nat Med* 2014; 20:596-8.
- [37] Tessier-Cloutier B, Kalloger SE, Al-Kandari M, et al. Programmed cell death ligand 1 cut-point is associated with reduced disease specific survival in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer* 2017; 17:618.
- [38] Imai D, Yoshizumi T, Okano S, et al. The prognostic impact of programmed cell death ligand 1 and human leukocyte antigen class I in pancreatic cancer. *Cancer Med* 2017; 6:1614-26.
- [39] Peng H, Chen B, Huang W, et al. Reprogramming tumor-associated macrophages to reverse EGFR T790M resistance by dual-targeting codelivery of gefitinib/vorinostat. *Nano Lett.* 2017; 17:7684-90.

LEGENDA DELLE FIGURE

Fig.1 Immagine rappresentativa in ematossilina-eosina di un caso di UCOGC con presenza dei tipi cellulari descritti. In questo caso si può inoltre osservare deposizione di matrice osteoide.

Fig. 2 Figura di Kaplan-Meier che rappresenta la migliore sopravvivenza dei pazienti affetti da UCOGC “puro” vs. UCOGC associato ad adenocarcinoma.

Fig. 3 Immagine rappresentativa dei pattern di colorazione alle indagini immunohistochimiche. A: caso in cui vi sono linfociti PD-1 positivi; essi sono collocati in sede peritumorale (le frecce indicano il fronte di avanzamento tumorale); B: caso di UCOGC puro positivo per PD-L1; si noti come gli osteoclasti (freccia) siano negativi; C: adenocarcinoma duttale associato ad UCOGC: intensa positività per PD-L1; D: la colorazione immunohistochimica per CD163 evidenzia una diffusa rete di macrofagi del tipo TAM2 in queste neoplasie, con intensa positività.

Fig. 4 Figura di Kaplan-Meier che rappresenta la migliore sopravvivenza dei pazienti che presentano assenza di espressione di PD-L1.

Figura 1.

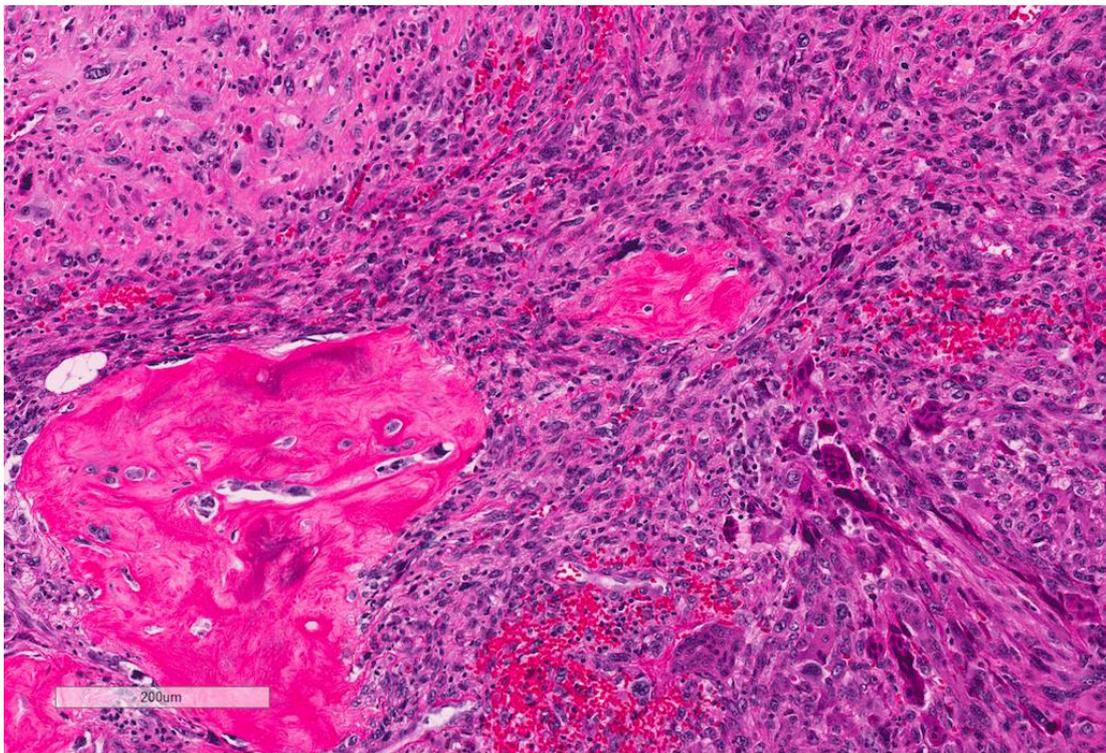


Figura 2.

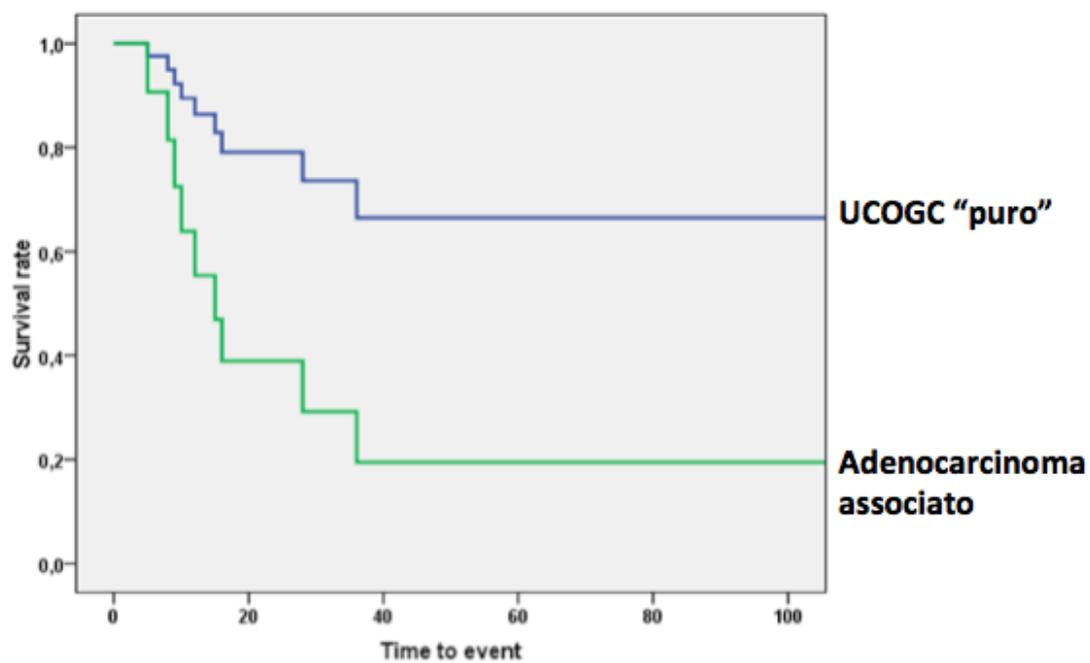


Figura 3.

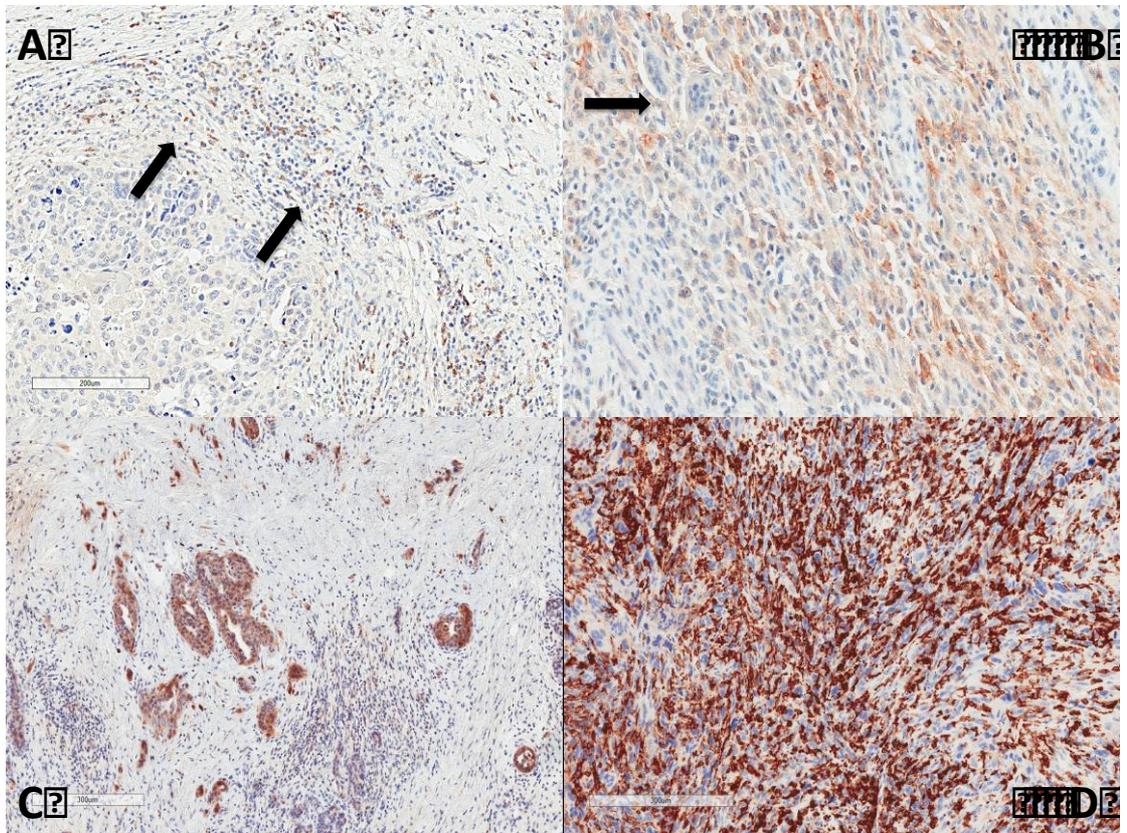


Figura 4.

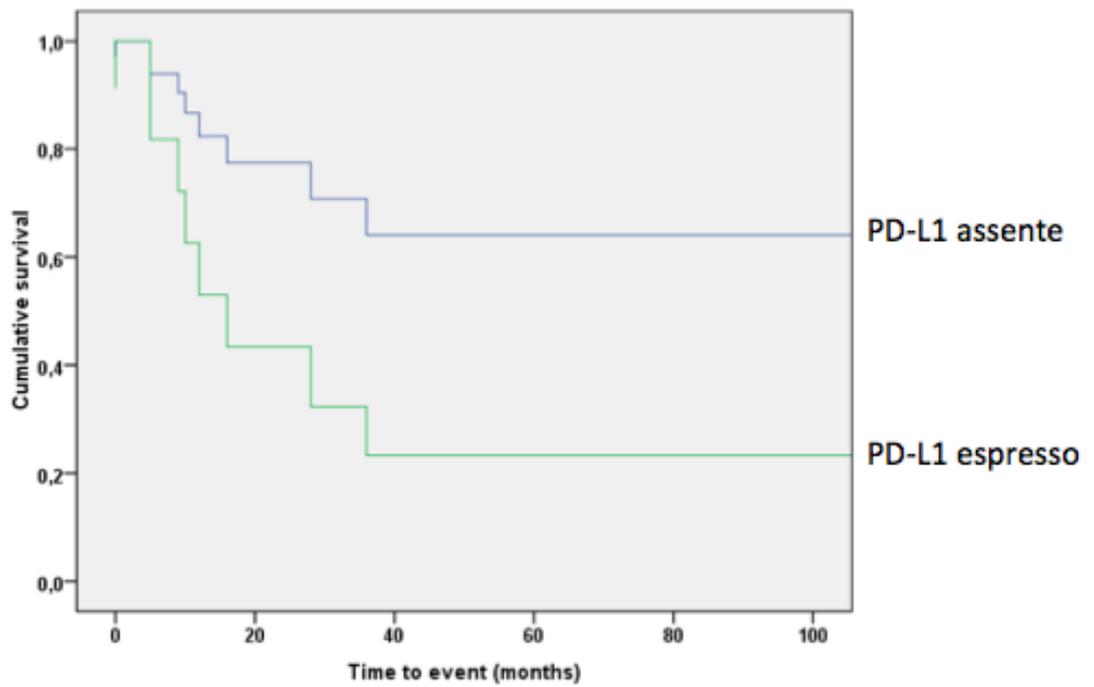


Tabella 1. Caratteristiche clinico-patologiche dei carcinomi indifferenziati del pancreas con cellule giganti simili-osteoclastiche inclusi nello studio.

Campione	Età	Sesso	NeCHT	Chirurgia	OS (mesi)	Neoplasia associata	PanIN (grado)	Crescita intraduttale	Formazione di osteoide	pT del TNM	Grandezza del tumore (cm)	Metastasi infondali	Invasione vascolare	Invasione perineurale
OST1	71	F	No	W	NA	No	No	Si	No	T2	2.5	No	Si	Si
OST2	38	F	No	PD	NA	MCN/PDAC	No	Si	No	T3	10.5	No	No	No
OST3	69	M	No	W	113	No	Si (alto)	No	No	T3	2.2	Si	Si	Si
OST4	85	F	No	W	9	No	Si (alto)	Si	No	T3	6.5	Si	Si	Si
OST5	66	M	No	W	8	PDAC	Si (alto)	Si	Si	T2	2.0	No	Si	No
OST6	55	F	No	W	28	PDAC	Si (alto)	Si	No	T3	3.0	No	Si	Si
OST7	65	M	No	PD	NA	No	No	No	No	T3	1.5	Si	Si	Si
OST8	69	F	Si	W	Vivo	No	Si (alto)	Si	Si	T3	2.5	No	Si	Si
OST9	72	M	No	W	15	PDAC	Si (alto)	No	No	T2	2.5	No	Si	No
OST10	49	F	No	W	0	PDAC	Si (alto)	Si	No	T3	4.0	Si	Si	Si
OST11	54	M	No	W	10	PDAC	Si (alto)	Si	No	T3	3.7	Si	Si	Si
OST12	58	M	Si	W	Vivo	No	No	No	No	T3	3.2	Si	Si	Si
OST13	78	F	Si	PD	Vivo	PDAC	Si (alto)	No	No	T2	3.5	Si	Si	Si
OST14	68	M	No	W	16	No	No	Si	No	T3	3.0	No	Si	Si
OST15	64	M	No	PD	36	PDAC	Si (alto)	No	No	T2	4.0	No	Si	No
OST16	66	F	Si	W	Vivo	No	Si (alto)	No	No	T3	1.3	No	Si	Si
OST17	64	F	No	PD	Vivo	MCN/PDAC	No	Si	No	T2	4.0	No	Si	Si
OST18	58	F	No	W	NA	PDAC	Si (alto)	No	Si	T3	4.0	Si	Si	Si
OST19	68	M	No	W	5	PDAC	Si (alto)	No	No	T1	1.2	No	Si	Si
OST20	64	F	No	W	12	PDAC	Si (alto)	Si	No	T3	4.0	Si	Si	Si
OST21	70	M	No	W	Vivo	No	No	No	No	T3	3.8	No	Si	Si
OST22	80	F	No	W	NA	IPMN/PDAC	Si (alto)	Si	Si	T3	5.0	Si	Si	Si

NeCHT: chemioterapia neo-adiuvante, OS: overall survival, W: resezione sec. Whipple, PD: pancreasectomia distale, NA: non disponibile, MCN: neoplasia cistica mucinosa, PDAC: adenocarcinoma duttale

Tabella 2. Mutazioni somatiche in potenziali geni driver*

Caso	Simbolo gene	Posizione della mutazione		Tipo di mutazione	Conseguenza biologica	% Letture di mutazione
		Chromosoma	Nucleotide			
OST7						
	BAP1	chr3_52416233-52416233_G_	H193Mfs*38	Delezione	Frameshift	40%
	KRAS	chr12_25289551-25289551_C_A	12G>V	Sostituzione	Nonsynonymous coding	14%
	TTN	chr2_179157394-179157394_A_T	17691N>K	Sostituzione	Nonsynonymous coding	14%
	TP53	chr2_179157394-179157394_T	D17692Rfs*8	Inserzione	Frameshift	14%
OST11						
	GLI3	chr7_42046261-42046261_A_C	310I>R	Sostituzione	Nonsynonymous coding	20%
	IDH2	chr15_88446520-88446520_C_T	36R>Q	Sostituzione	Nonsynonymous coding	31%
	KRAS	chr12_25289551-25289551_C_T	12G>D	Sostituzione	Nonsynonymous coding	37%
	TP53	chr17_7518295-7518295_C_A	237M>I	Sostituzione	Nonsynonymous coding	41%
OST17						
	KRAS	chr12_25289551-25289551_C_A	12G>V	Sostituzione	Nonsynonymous coding	19%
	MEGF8	chr19_47572331-47572331_C_T	2701T>I	Sostituzione	Nonsynonymous coding	14%
	TP53	chr17_7518334-7518334_C_G	673-1G>C	Sostituzione	Splice site acceptor	10%
OST18						
	KRAS	chr12_25289552-25289552_C_G	12G>R	Sostituzione	Nonsynonymous coding	16%
	MEGF8	chr19_47540731-47540731_T_C	668V>A	Sostituzione	Nonsynonymous coding	22%
	SERPINA3	chr14_94155509-94155509_A_C	290M>L	Sostituzione	Nonsynonymous coding	14%
	SMAD4	chr18_46845890-46845890_G_A	352G>E	Sostituzione	Nonsynonymous coding	8%
	TP53	chr17_7519128-7519128_C_A	176C>F	Sostituzione	Nonsynonymous coding	31%
	TTN	chr2_179275148-179275148_G_A	8924T>M	Sostituzione	Nonsynonymous coding	18%
OST19						
	GLI3	chr7_41971628-41971628_C_T	1190A>T	Sostituzione	Nonsynonymous coding	12%
	KRAS	chr12_25289551-25289551_C_T	12G>D	Sostituzione	Nonsynonymous coding	5%
	SERPINA3	chr14_94155509-94155509_A_C	290M>L	Sostituzione	Nonsynonymous coding	14%
	TP53	chr17_7518988-7518988_G_A	196R>X	Sostituzione	Nonsense	18%
OST20						
	KRAS	chr12_25289551-25289551_C_T	12G>D	Sostituzione	Nonsynonymous coding	42%
	MAGEB4	chrX_30170382-30170382_C_T	70S>F	Sostituzione	Nonsynonymous coding	12%
	TP53	chr17_7519180-7519180_C_G	159A>P	Sostituzione	Nonsynonymous coding	30%
OST21						
	CDKN2A	chr9_21961028-21961028_C_T	110W>X	Sostituzione	Nonsense	36%
	KRAS	chr12_25289551-25289551_C_A	12G>V	Sostituzione	Nonsynonymous coding	32%
	MAGEB4	chrX_30170642-30170642_C_T	157R>C	Sostituzione	Nonsynonymous coding	33%
	TP53	chr17_7519119-7519119_T_C	179H>R	Sostituzione	Nonsynonymous coding	30%
	TTN	chr2_179311236-179311236_C_T	3486R>Q	Sostituzione	Nonsynonymous coding	13%
OST22						
	CDKN2A	chr9_21964684-21964684_G_A	48P>L	Sostituzione	Nonsynonymous coding	43%
	KRAS	chr12_25289551-25289551_C_A	12G>V	Sostituzione	Nonsynonymous coding	6%
	PTEN	chr10_89682868-89682868_T_G	124C>W	Sostituzione	Nonsynonymous coding	10%
	TP53	chr17_7518264-7518264_G_A	248R>W	Sostituzione	Nonsynonymous coding	36%

*Potenziali driver sono geni oncoforniti in un ruolo noto nella tumorigenesi oppure quelli mutati più in un ICGC nel presente studio.

Tabella 3. Espressione dei marcatori PD-L1, PD-1 e CD163 in UCOGC					
Se neoplasia associata, il primo valore tra parentesi indica UCOGC, il secondo la neoplasia associata.					
Campione	OS (mesi)	Neoplasia associata	PD-L1	PD-1	CD163
UCOGC PANCREAS					
OST3	113	No	ABS	ABS	(+++)
OST4	9	No	POS [10%]	(+PT, Very Rare)	(+++)
OST6	28	PDAC	ABS	ABS	(+++)
OST7	NA	No	ABS	(+PT)	(+++)
OST8	Vivo (72)	No	ABS	(+PT)	(+++)
OST10	0	PDAC	POS [5% (15%)]	(ABS)	(+++)
OST11	10	PDAC	POS [10% (20%+)]	(ABS)	(+++)
OST12	Vivo (36)	No	POS [30%]	(+PT)	(+++)
OST13	Vivo (22)	PDAC	POS [2% (2%)]	(ABS)	(+++)
OST14	16	No	POS [15%]	(+PT)	(+++)
OST15	36	PDAC	ABS	(ABS)	(+++)
OST16	Vivo (44)	No	ABS	ABS	(+++)
OST17	Vivo (38)	MCN/PDAC	POS [40% (5% in MCN)]	ABS	(+++)
OST18	NA	PDAC	POS [5% (5%)]	(ABS)	(+++)
OST19	5	PDAC	POS [30% (40%)]	(+PT, Very Rare)	(+++)
OST20	12	PDAC	POS [5% (5%)]	(ABS)	(+++)
OST23	NA	No	ABS	(+PT)	(+++)
OST24	NA	No	ABS	(+PT)	(+++)
OST25	NA	PDAC	POS [50% (50%)]	ABS	(+++)
OST26	NA	PDAC	POS [5% (20%)]	ABS	(+++)
OST27	NA	PDAC	POS [15% (30%)]	(ABS)	(+++)
OST28	Vivo (4)	No	POS [40%]	(+PT)	(+++)
OST29	NA	IPMN/PDAC	POS [10% (10%)]	(+PT)	(+++)
UCOGC NON PANCREAS					
OST30	NA	BC	POS [50%]	(+++)	(+++)
OST31	NA	LM	ABS	ABS	(+++)
OST32	NA	BRC	ABS	(+)	(+++)
OST33	NA	LM	POS [10%]	(++)	(+++)
OST34	NA	LM	POS [2%]	(++)	(+++)

ABS=Assente; POS=positivo; PDAC=pancreatic adenocarcinoma; MCN=neoplasiaistica mucinosa; IPMN:neoplasia papillare mucinosa intraduttale; PT=peritumoral; BC=bladder-BR=breast-cancer, LM=leiomyosarcoma, with osteoclast like giant cells.