



Collegio Ghislieri
Centro per la Comunicazione e la Ricerca

Progetto "Progressi in Biologia e Medicina"

5° Corso di formazione avanzata

Cellule staminali normali e neoplastiche 2007

12 - 16 febbraio 2007, Collegio Ghislieri, Pavia

A cura di Carlo Bernasconi

5° Corso di formazione avanzata

**Cellule staminali
normali e neoplastiche 2007**



Collegio Ghislieri

Centro per la Comunicazione e la Ricerca

Progetto “Progressi in Biologia e Medicina”

5° Corso di formazione avanzata

**Cellule staminali
normali e neoplastiche 2007**

12-16 febbraio 2007, Collegio Ghislieri, Pavia

A cura di Carlo Bernasconi

© Copyright 2007 

Edizioni Internazionali srl
Divisione EDIMES - Edizioni Medico-Scientifiche - Pavia

Via Riviera, 39 - 27100 Pavia
Tel. 0382526253 - Fax 0382423120
E-mail: edint.edimes@tin.it

Tutti i diritti sono riservati.
Nessuna parte può essere riprodotta in alcun modo
(compresi i microfilm e le copie fotostatiche)
senza il permesso scritto dell'editore.

Indice

Prefazione pag. IX

Biologia delle cellule staminali

1. Biologia delle cellule staminali: come definire oggi una cellula staminale; cellule staminali embrionali, germinali, somatiche; sviluppo embrionale e differenziazione tissutale » 3
CarloAlberto Redi
2. Riprogrammazione nucleare, cellulare e plasticità differenziativa » 17
Maurizio Zuccotti, Silvia Garagna, CarloAlberto Redi

Microambiente

3. Cellule Staminali e loro nicchie » 37
Tui Neri
4. Microambiente Osteo-midollare » 45
Gian Luigi Castoldi
5. Homing delle cellule staminali » 50
Carlo Bernasconi

Midollo osseo: una ricca sorgente di cellule staminali

6. Il sistema delle cellule staminali ematopoietiche » 59
Gian Luigi Castoldi
7. Progenitori endoteliali e loro mobilizzazione » 66
Paola Romagnani
8. Heterogeneous populations of stem cells reside in the bone marrow: which therapeutic implications? » 72
Mariusz Z. Ratajczak
9. Cellule staminali mesenchimali e cellule progenitrici adulte multipotenti » 82
Carlo Bernasconi

Trapianto di cellule staminali ematopoietiche: problemi aperti

10. Come migliorare i risultati del trapianto autologo:
l'esempio dei linfomi maligni » 91
*Corrado Tarella, Manuela Zanni, Alberto Rocci, Marco Ruella,
Angela Gueli, Irene Ricca*
11. Trapianto allogenico e controllo della GvHD » 97
Franco Aversa
12. Espansione di cellule staminali emopoietiche:
speranza o realtà? » 104
Wanda Piacibello, Loretta Gammaitoni, Ymera Pignochino
13. Trapianto di cellule staminali emopoietiche del sangue placentare ... » 112
*Franco Locatelli, Maria Ester Bernardo, Tommaso Mina,
Elena Bergami*

Prospettive di terapia cellulare

14. Dendritic Cell Vaccination for Multiple Myeloma using
Patient-Specific Tumor Idiotype protein or Idiotype
(VDJ)-Derived Class I-Restricted Peptides » 122
Roberto M. Lemoli
15. L'utilizzo di cellule CIK per la recidiva dopo trapianto
di midollo osseo allogenico » 130
M. Introna, M. Franceschetti, A. Rambaldi
16. Immunoterapia cellulare adottiva con linfociti T citotossici » 135
Rita Maccario

Cellule staminali e medicina rigenerativa

17. Mobilization of Bone Marrow-Derived Hematopoietic
and Endothelial Stem Cells after Liver Injury » 145
Roberto M. Lemoli
18. Prospettive di terapia rigenerativa extra-ematologica
con cellule staminali osteomidollari » 158
Carlo Bernasconi
19. Cellule progenitrici multipotenti isolate da glomeruli renali
umani adulti » 164
Paola Romagnani

20. Rigenerazione miocardica mediata da cellule staminali:
potenziale endogeno e fonti extracardiache » 169
*Federico Quaini, Ezio Musso, Francesco Fagnoni, Konrad Urbanek,
Gallia Graiani, Caterina Frati, Costanza Lagrasta, Francesca Ferraro,
Alice Belletti, Mirca Lazzaretti, Stefano Cavalli, Alessandro Boni,
Donatella Stilli, Eugenio Quaini, Roberto Sala, Annarosa Leri,
Piero Anversa*
21. The therapeutic plasticity of neural stem/precursor cells
in multiple sclerosis » 186
Stefano Pluchino, Gianvito Martino
22. Impiego di cellule staminali nella terapia
delle distrofie muscolari » 194
Nereo Bresolin
23. Role of stem cell in diabetes therapy » 197
Lorenzo Piemonti
24. Cellule staminali e riparazione renale » 208
Marina Morigi

Cellule staminali neoplastiche

25. Identificazione delle cellule staminali leucemiche/tumorali:
necessità diagnostica per terapie innovative » 217
Carlo Bernasconi
26. Cellule staminali nel tumore della mammella » 225
*Maria Grazia Daidone, Claudi Casarsa, Alice Reduzzi,
Nadia Zaffaroni*
27. Colorectal cancer stem cells, MET and metastasis » 231
Carla Boccaccio

Prefazione

Gli studi sulle cellule staminali hanno avuto in questi ultimi uno straordinario impulso, che ha portato all'acquisizione di importanti informazioni sulle caratteristiche biologiche proprie di tali cellule e sulle prospettive per un loro impiego clinico. A due anni di distanza dal nostro primo corso sulle cellule staminali adulte è parso quindi opportuno aggiornare le conoscenze in questo settore della ricerca biomedica.

Nell'organizzazione del corso attuale è stato seguito, come in passato, l'indirizzo di considerare dapprima gli aspetti biologici e poi le prospettive di applicazione clinica. Nelle prime sessioni verranno quindi trattati gli argomenti riguardanti la biologia delle cellule staminali embrionali e adulte, e anche il microambiente tessutale e i meccanismi di homing delle cellule staminali stesse. Uno spazio adeguato sarà riservato alla presentazione e discussione delle ricerche sul midollo osseo, ricca sorgente di cellule staminali il cui studio ha aperto la via alle attuali terapie trapiantologiche cellulari, che presentano ancora parecchi problemi non risolti. Nel considerare le potenzialità della medicina rigenerativa, verranno dapprima esaminati i meccanismi di stimolazione della rigenerazione cellulare dopo danno tessutale, e poi verranno valutati i risultati sinora raggiunti con l'impiego di cellule staminali di differente origine nel tentativo di riparare alcuni organi o apparati danneggiati.

L'ultimo argomento trattato sarà quello delle cellule staminali tumorali, che sta modificando profondamente i concetti della biologia dei tumori, ponendo le premesse per impostare in modo completamente innovativo trattamenti antitumorali potenzialmente eradicanti.

La didattica è impostata in modo da lasciare ampio spazio alla discussione e allo scambio di idee. In tal senso sono stati preventivamente informati i Docenti, riconosciuti esperti degli argomenti trattati, che qui ringrazio per aver generosamente accettato il caloroso invito rivolto loro dal Collegio Ghislieri, inviando anche il testo riassuntivo delle loro relazioni. Questi testi, riuniti nel presente volume, costituiscono una valida guida per l'apprendimento e la discussione. Auguro a tutti i partecipanti di poter trarre dalla frequenza al corso il maggior vantaggio per il loro lavoro professionale e di ricerca.

Carlo Bernasconi

Pavia, 12 febbraio 2007

BIOLOGIA
DELLE CELLULE STAMINALI

Biologia delle cellule staminali: come definire oggi una cellula staminale; cellule staminali embrionali, germinali, somatiche; sviluppo embrionale e differenziazione tissutale

CarloAlberto Redi

Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Università di Pavia.

Direttore Scientifico Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Le cellule staminali (SC), embrionali (ES) e somatiche o adulte (SSC), sono cellule dotate della singolare proprietà di rinnovarsi mantenendo sia caratteristiche di cellule indifferenziate che la capacità di dar luogo a cellule che vanno differenziandosi. Questa proprietà è diversamente graduata, ve ne sono di totipotenti, pluripotenti, multipotenti ed unipotenti, in dipendenza del grado di rinnovo e differenziazione finale a cui le cellule figlie vanno incontro. La biologia delle SC è oggi una delle grandi *hot topics* in biologia e medicina poiché la staminalità gioca un ruolo di primo piano sia nello sviluppo ontogenetico di un individuo sia nel mantenimento della omeostasi dei tessuti dell'individuo adulto. Il campo delle SC è aperto anche ad un mondo di riflessioni che, legittime nella appartenenza a discipline non squisitamente scientifiche, vengono disinvoltamente mescolate a quelle strettamente scientifiche. Deve dunque essere precisata la cornice all'interno della quale collocare i propri ambiti di lavoro e riflessione.

Rimando ai contributi elencati in bibliografia per la parte strettamente tecnica mentre qui preciso la cornice dei dati e delle riflessioni che definiscono il contorno all'interno del quale collocare la biologia delle SC.

Larga parte degli equivoci che alimentano e sostengono alcune posizioni di intransigenza e di fondamentalismo nascono proprio da preconcetti non vagliati criticamente e da riferimenti troppo generici riguardo alla biologia delle SC, a partire dal lessico impiegato. Fenomeno questo del disinvolto impiego in ambito colloquiale di concetti e lessico relativi alle SC da parte di decisori politici e pensatori vari a cui non sono estranei anche gli scienziati. Anche le nozioni di individuo, persona, vita, embrione, nozioni intimamente legate alla biologia delle SC, sono spesso impiegate in maniera distorta e ciò porta a radicalizzare posizioni ideologiche preconcepite, più che a un sereno confronto su di essi. È dunque necessario definire i dettagli scientifici e tecnici della biologia delle SC: cosa

sono le SC innanzitutto, e quali le procedure della loro derivazione. Ed inoltre, è importante chiarire come solo l'adozione del metodo scientifico, un metodo intrinsecamente ed operativamente *laico*, può aiutare a sviluppare considerazioni criticamente aperte al nuovo, all'avanzamento del sapere. Solo questa attitudine mentale permette di non arroccarsi su posizioni fissiste, immutabili nel tempo, e di ricollocare le proprie convinzioni nel tempo mano a mano che gli sviluppi del sapere ci offrono nuovi scenari di riflessione da cui, in una relazione circolare, derivare nuovi epistemi.

La libertà e lo sviluppo della ricerca sulle SC sono oggi condizioni necessarie per il futuro della medicina e della qualità della vita dei cittadini. Solo la laicità delle istituzioni può assicurare, attraverso la trasparenza della discussione pubblica e dei processi decisionali, di trovare un punto di equilibrio tra le varie posizioni, con il rifiuto di ogni fondamentalismo e di ogni arroganza culturale o politica, per sviluppare norme e decisioni capaci di permettere l'acquisizione della piena conoscenza scientifica di tutti gli aspetti della biologia delle SC.

La biologia delle SC mette alla prova molte delle categorie concettuali della cultura contemporanea come libertà, progresso, democrazia, giustizia, intervenendo in ogni campo della vita e della salute degli individui. L'accantonamento del criterio di laicità e una sostanziale sovrapposizione di criteri religiosi ed ideologici per indirizzare la ricerca sulle SC mettono a repentaglio la libertà e la qualità della vita degli individui che in gran parte, oggi, nelle società occidentali, sono assicurate dalla ricerca in biologia (genomica, proteomica, nanotecnologie, ecc). Tutti noi originiamo da una cellula, lo zigote, frutto della unione dello spermatozoo e della cellula uovo, ed attraverso lo sviluppo embrionale e fetale da adulti siamo composti da circa un milione di miliardi di cellule. Tutte queste cellule originano dallo zigote che per questa sua capacità è per definizione "totipotente". Lo zigote e le cellule dell'embrione nelle prime fasi dello sviluppo (blastocisti) possiedono tutte le informazioni, a livello nucleare e citoplasmatico, necessarie alla produzione dei diversi tipi cellulari che compongono un nuovo individuo. Il cambiamento nel numero e nella tipologia dei geni che si esprimono in ogni fase dello sviluppo porta dapprima alla determinazione del destino differenziativo delle cellule e in momenti successivi alla loro effettiva differenziazione nei diversi tipi cellulari presenti nell'organismo adulto. In alcuni tessuti dell'adulto permangono cellule che non andranno mai incontro al processo di determinazione e differenziamento, mantenendo la capacità di rinnovarsi. Queste cellule sono dette "staminali", cellule in grado di sostituire quelle differenzianti nei tessuti caratterizzati da un alto ricambio cellulare (ad esempio, le cellule germinali maschili dell'epitelio seminifero o le cellule del tessuto ematopoietico, le cellule del sangue) o da processi di continua morte cellulare (ad esempio nell'epidermide). Le cellule staminali mantengono capacità proliferativa durante tutta la vita dell'individuo e quando si moltiplicano danno origine ad una cellula che rimane di tipo staminale mentre l'altra inizia il processo differenziativo. Si dice così che le cellule staminali si dividono in modo asimmetrico poiché le due cellule figlie hanno destini differenziativi funzionali diversi.

Con il procedere dello sviluppo embrionale e fetale il numero di cellule staminali si riduce e nell'individuo adulto sono presenti solo in alcuni precisi distretti tissutali. Dalle blastocisti si possono isolare le cellule del nodo embrionale e coltivarle fino ad ottenerne milioni, le cosiddette "ES cells" (Embryonic Stem cells) la cui caratteristica principale è l'elevata capacità proliferativa unita alla capacità di differenziarsi in qualsiasi altro tipo cellulare.

Da questa breve descrizione deriva il concetto di SC: un particolare tipo di cellula, come già detto, che ha la unica capacità di rinnovare se stessa e di dare origine ad uno dei più di 200 tipi diversi di cellule specializzate (osso, muscolo, fegato, nervi, ecc.) che costituiscono il corpo di un vertebrato (come detto, quello umano è composto di circa un milione di miliardi di cellule: in numeri, 10^{15} !). In altre parole, la gran parte delle cellule che compongono il corpo, ad esempio le cellule del cuore o della pelle, sono specializzate per compiere una funzione specifica mentre le SC non sono specializzate e rimangono indifferenziate sino al momento in cui ricevono degli stimoli che le portano a svilupparsi in cellule specializzate, differenziate. La caratteristica di mantenere la capacità proliferativa associata alla abilità a differenziarsi in una cellula specializzata è unica delle SC. Molti dei termini che si impiegano per definire le SC derivano dal loro comportamento quando si trovano nel corpo (in vivo), ad esempio ES (dall'embrione) e somatiche o adulte, SSC, (dalle fasi di sviluppo postembrionali); oppure quando si studiano in particolari condizioni di coltura cellulare (in vitro); staminali transdifferenziate. Lo zigote è la SC totipotente poichè ha la capacità di generare tutte le cellule e tutti i tipi cellulari che compongono un nuovo individuo. Le cellule che costituiscono le prime fasi dello sviluppo embrionale (la blastocisti) sono dette pluripotenti poichè capaci di generare le cellule che si differenziano nei tre foglietti embrionali, endoderma, mesoderma ed ectoderma che poi daranno origine a tutti i tipi di cellule dei vari tessuti ed organi. SC multipotenti ed unipotenti sono dette quelle che hanno un minore grado di capacità differenziativa, e che si ritrovano nelle fasi ultime dello sviluppo fetale e nell'adulto. Queste staminali danno origine solo al tipo di cellule del tessuto in cui si trovano: si pensi alle staminali del sangue e dell'epidermide che provvedono al mantenimento dei rispettivi tessuti.

Per comprendere appieno il significato biologico del termine cellula staminale è bene conoscere chiaramente quale è la derivazione del termine staminale. Il termine rende l'inglese staminal, a sua volta un neo-latinismo (non è mai esistito in lat. un agg. *staminalis, -e!) creato in ambiente scientifico anglosassone su materiale latino. Alla base della forma vi è, comunque, il lat. STAMEN, -INIS, sost. ntr. formato da due distinti morfemi, - la base lessicale (di origine indeuropea) *sta- "stare saldamente collocato; stare; - il morfema derivazionale (di origine indeuropea) *-men-, usato ampiamente per la formazione di sostantivi indicanti, inizialmente, il prodursi dell'effetto di un'azione e poi, per traslato, l'effetto dell'azione stessa.

Qualche esempio, tratto dal latino: ag-men "l'esercito in marcia"; lu-men "il bagliore della luce" (vs. lux "la luce, vera e propria); ful-men, il bagliore precedente il tuono; cri-men, l'azione del separare/selezionare e poi, per traslato, l'og-

getto della selezione; se-men, inizialmente, l'azione del seminare, poi, ciò che si semina.

STAMEN è dunque inizialmente un termine tecnico della tessitura ed indica l'ordito, del tessuto (lett. "ciò che sta fermamente saldo"), sul quale si sovrappone la trama, a formare il tessuto nella sua forma finale. Poi indica più in generale "il filo" e, con valore traslato, "il filo della vita; il destino; la sorte; lo stame della vita".

Ciò che è importante notare, nel valore semantico di lat. stamen, è l'idea (astratta) di qualche cosa che "sta fermo, stabilmente", che vale quale "principio di fondo, basilare".

Da qui cellula staminale, basilare, fondante.

Recenti studi hanno messo in dubbio che le SSC abbiano una capacità differenziativa limitata solo ad alcuni tessuti ed al mantenimento delle popolazioni cellulari differenziate del tessuto di appartenenza. Infatti, a partire dalla seconda metà degli anni '90 è stata dimostrata la presenza di SC in tessuti differenziati nei quali si riteneva che le SC non fossero più presenti, ad esempio nel tessuto nervoso centrale. Il contributo più importante di questi studi è stato quello di rivelare la capacità di differenziamento delle SC non solo nei tipi cellulari propri del tessuto di appartenenza, ma anche in tipi cellulari di tessuti diversi grazie ad un processo detto di transdifferenziazione. Vari studi hanno dimostrato la capacità delle SSC di transdifferenziarsi in tipi cellulari diversi sia in vitro che in vivo. SSC del sangue sono state differenziate in cellule muscolari, cardiache, endoteliali, gliali, epatiche e del dotto biliare. A questo proposito vale la pena di ricordare lo straordinario esperimento effettuato nel 2001, nel topo, da Diane Krause (della Università di Yale), nel quale si dimostra la capacità di una singola SSC del midollo osseo di ripopolare in vivo il midollo osseo stesso di animali irradiati letalmente, ma anche di transdifferenziarsi in cellule epiteliali di tessuti diversi quali fegato, polmone e pelle. SSC sono state ritrovate anche nel muscolo striato scheletrico in grado di originare cellule del midollo osseo; nel tessuto nervoso capaci di differenziarsi in cellule nucleate del sangue, in cellule muscolari scheletriche ed in diversi tessuti embrionali; nel tessuto adiposo (si pensi alla liposuzione quale fonte di SSC) in grado di differenziarsi in cellule adipose, della cartilagine, dell'osso e del muscolo; della regione del limbus della cornea in cellule della cornea; cellule endoteliali in cellule cardiache; SSC sono state recentemente descritte anche nel cuore in seguito ad infarto, organo nel quale si riteneva non fossero presenti.

L'elenco dei tessuti e degli organi dai quali è possibile ottenere SSC in grado di transdifferenziarsi in vitro o in vivo si allunga di giorno in giorno (di recente sono state trovate anche nella polpa dei denti decidui). È importante ricordare che le SSC sono localizzate in specifiche "nicchie" definite da un contesto biochimico, più che anatomico, caratterizzate da un microambiente complesso che permette alle SSC di mantenere le proprie caratteristiche. Le conoscenze relative alla biologia delle SC sono ancora molto limitate e l'opportunità di riconoscerle e svelarne le caratteristiche biologiche per giungere ad applicazioni terapeutiche su vasta scala dipenderà essenzialmente dai finanziamenti erogati a queste ricerche.

Una cronologia degli sviluppi e delle ricerche sulle SC può aiutare a meglio inquadrare tutte le problematiche, scientifiche, etiche e legali, legate alla loro derivazione ed al loro impiego.

Si deve al lavoro di ricercatori canadesi della McGill University (Montreal, Quebec, Canada), nel corso degli anni '50 dell'ultimo secolo, la prova dell'esistenza di SC. Sino agli inizi degli anni '50 si era teorizzata la loro esistenza in base al concetto di "stato dinamico dei costituenti del corpo", concetto già presente in Eraclito (V secolo avanti Cristo). Negli anni '30 e '40 viene sviluppata la tecnica di autoradiografia grazie alla quale è possibile introdurre nello studio delle cellule e dei tessuti, sino ad allora studiati nelle loro relazioni architettoniche nelle tre direzioni spaziali, la dimensione tempo. Charles Leblond ed i suoi collaboratori (H. Cheng, W. Chang, J. Marques Pereira, B. Messier, J. Nadler) rivelano così la dinamica della assunzione e lo spostamento tra diversi tipi cellulari di sostanze (normalmente presenti nelle cellule) marcate con elementi chimici capaci di emettere elettroni (ad esempio isotopi radioattivi di idrogeno, zolfo, carbonio). Dimostrano in tal modo che le cellule alla base dei villi intestinali sono capaci di dividersi in maniera asimmetrica, come si era ipotizzato, e sono staminali. Leblond ne dimostra l'esistenza anche nel testicolo, individuando un tipo particolare di spermatogonio (detto A) capace di assicurare il rinnovo costante delle cellule dell'epitelio seminifero (la cui esistenza era intuitivamente già stata ipotizzata: in caso contrario, dopo una singola eiaculazione, un maschio di mammifero sarebbe privo di spermatozoi). Ai lavori della scuola canadese segue una serie di contributi della comunità scientifica che dimostrano l'esistenza di SC in tutti i diversi compartimenti anatomici ed a partire da questi anni è un lento susseguirsi di tanti piccoli avanzamenti delle conoscenze che, come è tipico nella impresa scientifica, in breve tempo permettono applicazioni terapeutiche già oggi ben consolidate grazie all'impiego di SSC (trapianti di midollo osseo, pelle artificiale, cornea), altre, sia con SSC sia con ES, in via di definizione (Parkinson, infarto, diabete) o del tutto sperimentali (stroke spinali, Alzheimer, sclerosi amiotrofiche).

Negli anni '60, R. Cole, R.G. Edwards e J. Paul (1964 e 1966) alla Glasgow University (UK) isolano la prima colonia di ES (immortali) da blastocisti di coniglio e R.L. Gardner (1968) dimostra la capacità differenziativa di una singola ES nel topo. Nella decade successiva, M.J. Evans (1972) isola e caratterizza ES di topo mentre R.A. Fleischman e B. Mintz (1979) iniettano nelle placente di topi immunosoppressi staminali ematopoietiche embrionali e curano una anemia geneticamente determinata. Negli anni '80 M. J. Evans e M. H. Kaufman (1981) isolano e stabiliscono la prima linea cellulare di ES nel topo e S. Fishel (1984) ottiene le prime ES umane. Gli anni '90 vedono molti avanzamenti, A.M. Wobus (1991 e 1995) ottiene cellule del cuore da ES di topo e E.Y. Snyder (1992) dimostra che staminali neuronali embrionali sono trapiantabili ed attecchiscono nel cervelletto di topo. Ancora, S. Weiss (1992) isola SSC neuronali dal cervello di topi adulti mentre S. Okabe (1996) differenzia diversi tipi di cellule nervose da ES di topo. Le prime linee cellulari di ES umane (3 maschili e 2 femminili) e di scimmie macache vengono allestite da J. A. Thompson (1998) mentre M.J. Shamblott (1998) ottiene le prime linee di cellule staminali germinali (EG)

umane. La possibilità di coltivare cellule ES umane ottenute da blastocisti al quattordicesimo giorno di sviluppo è ovunque limitata alle blastocisti che provengono dalle cliniche di fecondazione in vitro e sono dunque embrioni in eccesso che non sono stati trasferiti nell'utero della madre, ma con il consenso dei genitori utilizzate per la ricerca. Unica eccezione è il sud Corea ove gli oociti possono essere ricavati da giovani donne che volontariamente donano queste cellule, e quindi possono essere impiegati per la creazione di zigoti ricostituiti se l'autorità di controllo accorda il permesso. In modo simile, ciò accade in Spagna ed in alcuni altri paesi. Il quadro legislativo di riferimento per questi paesi è il Regno Unito dove da diverse decadi le problematiche scientifiche, etiche e sociali legate ai temi della biologia della riproduzione (in senso lato) sono sviluppate in modo rigoroso. Agli inizi del nuovo secolo (2000) S.H. Lee produce neuroni dopaminergici da ES di topo mentre A. Vescovi e G. Cossu transdifferenziano SSC neuronali in cellule del sangue e del muscolo. Nell'anno 2001, N. Lumelsky ottiene cellule secernenti insulina da ES di topo e diversi gruppi scandinavi confermano che il trapianto di SSC neuronali, derivate da feti abortiti, sono efficaci nel trattamento del Parkinson (487 ad oggi); D. Orlic impiega SSC del midollo osseo per rigenerare cuori umani infartuati. Y. Jiang (2002) dimostra che SSC del midollo osseo possono formare diversi tipi di tessuto confermando il dato di D. Krause che, nei topi, con una singola SSC del midollo osseo è possibile ripopolare tutti i distretti anatomici. K. Hubner, H. Scholer e M. Boiani (2003) producono cellule germinali (oociti) da ES di topo. Nell'anno 2004 T. Barberi, del Memorial Sloan Kettering di New York, ottiene milioni di neuroni dopaminergici da una singola ES umana. Nel 2006 Giulio Cossu ed i suoi collaboratori dimostrano che mesangioblasti, eterologhi o autologhi ingegnerizzati, sono in grado di recuperare, nel modello canino, la distrofia di Duchenne. I contributi si susseguono ormai ad un ritmo incalzante. Sotto il profilo delle tecniche di derivazione va ricordata la scuola della Advanced Cell Technology di Robert Lanza con la dimostrazione che è possibile derivare linee di ES umane da un singolo blastomero estratto da morule allo stadio di 6-10 blastomeri.

Le ricerche sulle potenzialità che le SC hanno di differenziarsi in qualsiasi altro tipo cellulare sono condotte da almeno vent'anni, anche se non sono mai state sotto i riflettori dei media se non negli ultimi anni, in particolare a partire dal 1998. Ora, grazie ad importanti risultati alcuni dei quali sopra ricordati, promettono la produzione di nuove cellule e tessuti, forse anche organi, per lo sviluppo di nuove terapie per il morbo di Parkinson, l'Alzheimer, l'infarto, i tumori, il diabete, la osteoporosi, e molte altre patologie, generando grandi speranze ed aspettative sul loro impiego in ambito biomedico. Negli ultimi anni sono state migliorate le metodiche per il loro isolamento e la loro coltura ed è stata dimostrata la possibilità di produrre ES a partire da un nucleo di una cellula somatica terminalmente differenziata, prelevata ad esempio da una biopsia, ridando ad esso le caratteristiche di totipotenzialità che possedeva nello zigote. Ciò si può realizzare grazie ad una tecnica detta "trasferimento di nuclei di cellule somatiche" in cellule uovo private del loro nucleo i.e. oociti enucleati). Una svolta importantissima nella ricerca sulle SC è giunta infatti con la clonazione della pecora Dolly e

del topo Cumulina. Già Hans Spemann (embriologo sperimentale, premio Nobel per i suoi studi sul differenziamento cellulare), attorno agli anni 1920-1930, si chiedeva se terminata la differenziazione una cellula era ancora in grado di de-differenziarsi e riassumere lo stato di totipotenza caratteristico dello zigote. Gli esperimenti di Willmut e Campbell (*Nature* 385: 810-813, 1997), impiegando come modello animale la pecora e successivamente di Yanagimachi e collaboratori (*Nature* 394: 369-374, 1998), con il topo, hanno dato una chiara risposta stabilendo che il nucleo di cellule somatiche terminalmente differenziate, trasferito nel citoplasma di una cellula uovo enucleata, è in grado di acquisire un nuovo programma genetico e di iniziare e terminare lo sviluppo embrionale con la nascita di un nuovo individuo. Dal punto di vista genetico il nuovo individuo è una "copia genomica" del donatore della cellula somatica impiegata per il trasferimento nucleare: è un clone genetico prodotto per clonazione riproduttiva. Se il processo di clonazione riproduttiva viene interrotto alle fasi iniziali dello sviluppo (a livello di blastocisti) questa stessa tecnica permette di produrre ES. Si attua così una clonazione terapeutica.

Varie sono quindi le sorgenti di SC tra le quali sono da ricordare anche il cordone ombelicale (già esistono banche del cordone ombelicale, New York, Milano, ed una legge in Italia ne prevede la donazione e conservazione) ed il materiale derivante dagli aborti, spontanei o procurati. Da questi ultimi è possibile ricavare anche cellule EG, le cellule che parteciperanno alla formazione delle gonadi. Le EG sono cellule pluripotenti che fanno la loro comparsa alla 3^a settimana di sviluppo, nell'uomo, e sono in grado di moltiplicarsi e differenziarsi, come le ES, in quasi tutti i tipi cellulari presenti nell'individuo adulto. La loro difficile reperibilità ne ostacola però fortemente il possibile impiego quale sorgente di SC.

L'impiego delle SSC soffre di due grandi limitazioni, l'una numerica (sono poche e di difficile reperibilità) e l'altra fisiologica (dopo alcune divisioni cellulari in coltura tendono a perdere le caratteristiche di multipotenzialità). Diversamente, le cellule ES possono essere mantenute in coltura per moltissimi cicli di divisione, addirittura per più di dieci anni, senza perdere la pluripotenzialità ma la loro produzione incontra forti resistenze e limitazioni di natura etica.

Le caratteristiche delle SC ne permettono un impiego in medicina rigenerativa per terapie cellulari mirate a sostituire le cellule perse nel corso della senescenza o a causa di traumi o patologie. Basti pensare al trapianto di SSC ematopoietiche che, negli ultimi 20 anni, ha rappresentato una valida terapia per la cura di alcuni tumori del sangue e per gravi malattie ematologiche anche non neoplastiche. Nella possibilità di transdifferenziazione delle SC si intravedono grandi potenzialità terapeutiche per patologie ora ritenute incurabili.

Oltre alle applicazioni più tradizionali, quali il trattamento dei grandi ustionati (pelle artificiale) e di alcuni tipi di leucemie (trapianto di midollo osseo), le prime applicazioni terapeutiche più innovative delle SC sono già iniziate per la cura del morbo di Parkinson, di alcune patologie oculari (cornea), dell'infarto del miocardio e del diabete.

Il panorama appare quanto mai promettente e di particolare interesse può risultare la situazione legata alla terapia per il Parkinson dalla quale emergono i conflitti di

natura etica ed economici sottesi a queste terapie. In ambito europeo è stato dimostrato da ricercatori svedesi l'opportunità di recuperare la sintomatologia dei parkinsoniani per un periodo dai tre ai cinque anni con trapianti di SSC neuronali provenienti da materiale abortivo. Alcuni ricercatori statunitensi avevano criticato questo lavoro sostenendo di aver ottenuto risultati negativi nella ripetizione della terapia e la stampa aveva dato un grande risalto al fatto sostenendo che spesso i ricercatori millantano successi. La realtà è risultata però più complessa e si è dimostrato che i risultati negativi ottenuti dai ricercatori statunitensi erano legati alla loro procedura sperimentale che comprendeva una diversa tecnica chirurgica per il trapianto delle cellule e per una diversa metodica di coltura delle stesse. Ciò ha comportato una selezione negativa di quelle SSC che sono utili al recupero della malattia ed ottenibili solo da cellule direttamente isolate dal tessuto abortivo.

Per quanto riguarda il recupero della zona necrotica nella regione dell'infarto miocardico, l'esito del trapianto cellulare è risultato positivo in diversi centri, tra cui Duesseldorf e Padova, con il recupero funzionale dell'attività cardiaca. L'opportunità di trattare il diabete in particolare quello giovanile, risulta chiarissima dalla sperimentazione su modelli animali (le SC trasfuse organizzano isole di Langherans e producono insulina nel fegato) e pertanto il passaggio alla fase di sperimentazione sull'uomo sembra imminente.

In Italia, è da ricordare la terapia condotta utilizzando cellule staminali del limbus della cornea. Queste cellule vengono isolate dall'occhio sano di pazienti e coltivate in vitro fino al raggiungimento delle dimensioni di un'intera cornea. Successivamente, dopo aver rimosso dai pazienti il tessuto che impedisce la visione all'occhio malato, viene eseguito il trapianto con le nuove cellule. L'85%-90% dei pazienti conclude questo intervento con successo (in questo campo l'Italia vanta un primato mondiale con la banca degli occhi del veneto curata dal dott. De Luca). Un altro successo italiano è quello già ricordato del novembre 2006: il gruppo di ricerca di Giulio Cossu ha dimostrato che SSC (mesangioblasti) autologhe ed eterologhe sono in grado, nel modello canino della distrofia di Duchenne, di rimpiazzare e far crescere il muscolo ormai infiltrato ed in via di degenerazione.

Cellule ES di topo sono state differenziate in vitro in cellule epiteliali, muscolari, nervose o pancreatiche. Di recente, un gruppo di ricercatori dell'Università di Bonn e del National Institute of Neurological Disorders and Stroke negli Stati Uniti è riuscito a differenziare delle ES in cellule della glia, un tipo di cellula nervosa che produce lo strato di mielina che ricopre le fibre nervose. Queste cellule, quando trasferite nel cervello di topi deficienti per la produzione di mielina, sono state capaci di esprimere una normale attività sintetica di questa proteina. Un altro gruppo di ricercatori della Washington University School of Medicine ha prodotto, sempre a partire da ES, delle cellule nervose immature che se trasferite nella spina dorsale danneggiata di ratti, ne ristabiliscono le normali funzioni. Analoghi tentativi sulle scimmie e su alcuni pazienti (compiuti ad Harvard dal neurobiologo Evans Snyder) fanno ritenere non lontano nel tempo la possibilità di riparare motoneuroni con la riacquisizione delle funzioni deambulatorie (si pensi alle applicazioni per patologie quali i traumi spinali). La storia dei successi nei tra-

pianti di SSC ematopoietiche è alla base delle strategie oggi sviluppate per le terapie basate sui trapianti di ES. Va precisato che ad oggi non esistono pratiche terapeutiche di routine basate sull'impiego di ES; il loro impiego è ancora del tutto legato alla ricerca anche se la analisi della letteratura scientifica permette di vedere più vicine nel tempo alcune applicazioni delle terapie basate su trapianti di ES rispetto ad altre. Indubbiamente le ES possiedono caratteristiche, quali la pluripotenza e la capacità proliferativa illimitata, che le rendono estremamente attraenti per future terapie cellulari.

Nel prossimo futuro le linee più promettenti di ricerca riguardano la riprogrammazione genetica dei nuclei somatici di cellule terminalmente differenziate grazie al loro trasferimento all'interno di oociti enucleati ottenibili in grande quantità da animali di interesse economico (mucca, pecora) oppure grazie all'impiego di sostanze simili in composizione chimica alle sostanze presenti nel citoplasma della cellula uovo (citoplasto artificiale). L'obiettivo è quello di poter ottenere SC in grandi quantità a partire da cellule somatiche terminalmente differenziate senza incontrare limitazioni ed ostacoli di natura etica. A livello internazionale si delineano tre strategie di ricerca:

- 1) per le staminali somatiche: non vi è contesa;
- 2) per quelle embrionali: produzione ex novo da embrioni creati appositamente (come è lecito fare in Gran Bretagna, Belgio, Svezia, Israele, Singapore, Sud Corea e tra breve in Brasile e Cina) o da embrioni criopreservati destinati alla distruzione (il prelievo di staminali da questi ultimi è di fatto un prelievo da cadavere);
- 3) alcuni laboratori stanno sviluppando un "citoplasto artificiale" per riprogrammare geneticamente le cellule somatiche impiegando particolari miscele (fattori di trascrizione, ioni bivalenti, piccole molecole di RNA) al fine di ottenere ES senza limitazioni etiche.

Sebbene più lontano nel tempo, l'esito di queste ultime ricerche permetterebbe alla medicina rigenerativa di non incontrare ostacoli tecnici o barriere etiche e ciò aprirebbe vastissimi scenari applicativi in ambito biomedico e farmacologico. Si pensi alla possibilità di ottenere in vitro, impiegando una miscela di sostanze che mima la azione del citoplasma dell'oocita, la riprogrammazione genetica delle cellule somatiche ottenute da una biopsia, e ciò senza impiegare le cellule uovo. L'ottenimento degli oociti è il primo problema della clonazione, terapeutica o riproduttiva: se questa fosse lecita, le donne delle fasce socialmente meno protette dei paesi del terzo e quarto mondo si vedrebbero offrire danari per vendere oociti, con gravissimo danno per la loro salute. Questa via alternativa per la produzione di ES in assenza del gamete femminile, impiegando citoplasti naturali o artificiali, era già stata segnalata nell'anno 2002 nel rapporto della commissione presieduta dal Nobel Renato Dulbecco (commissione di studio sull'utilizzo delle cellule staminali per finalità terapeutiche), a suo tempo istituita dal Ministro della Sanità Prof. Umberto Veronesi. Nel rapporto Dulbecco, la commissione, dopo aver valutato le proposte del rapporto Donaldson per la ricerca sulle SC (www.dh.gov.uk), auspicava fortemente il sostegno a queste ricerche poiché da esse possono derivare applicazioni terapeutiche ad oggi di difficile praticabilità

per l'impossibilità di disporre di un numero sufficiente di cellule da trapiantare. Un solo esempio rende ragione della situazione: il materiale embrio/fetale di 5-6 aborti permette la raccolta di un numero di staminali neuronali utili per il trattamento ed il recupero funzionale (dai 2 ai 5-6 anni) di un solo paziente parkinsoniano. Questi numeri dicono chiaramente che questa strategia di intervento terapeutico non è perseguibile, altre fonti di SC sono necessarie. Per capire la dimensione delle necessità ed urgenze di intervento terapeutico, basti pensare che solo negli USA circa 60 milioni di persone presentano patologie del sistema cardiovascolare, più di 15 sono affette da diabete, 10 dalla osteoporosi, più di 4 dall'Alzheimer e più di 2 dal Parkinson. Una Europa sempre più longeva e con un tasso demografico inferiore a quello di sostituzione è una Europa destinata ad essere costituita in grande maggioranza da senescenti bisognosi delle terapie basate sull'impiego delle SC. L'ottenere un organo è da considerarsi ancora lontano: le cellule in differenziamento giungono a formare un organo anche grazie a messaggi di tipo posizionale, moltiplicandosi e crescendo su supporti specifici, supporti che oggi non riusciamo a riprodurre in vitro nonostante i progressi della bioingegneria dei materiali biologici. Non solo il mondo accademico è attivo a questo riguardo, ma anche diverse imprese mercantili. È chiaro l'intento di giungere alla produzione di significative quantità di SC sfruttando in particolare la possibilità di transdifferenziare (grazie all'impiego di particolari miscele di sostanze quali l'acido retinoico, l'insulina, triiodotironina, eritropoietina ed altre; è questo un campo di attivissima ricerca) le SC comunque ottenute, poiché la transdifferenziazione amplia di diversi ordini di grandezza la potenzialità produttiva dei diversi tipi di tessuti. Ciascuna di queste imprese adotta specifiche strategie di produzione (SC da embrione, da feto o da adulto) e di settore applicativo (cellule del sistema nervoso, del mesenchima, del sangue). Il settore più "tradizionale" è quello delle SC del sangue, ma con il progredire delle tecniche di prelievo, transdifferenziazione ed espansione in coltura i settori saranno sempre più numerosi. La Osiris Therapeutics, occupandosi di SC del mesenchima, mira alla produzione di diversi tipi cellulari - osteoblasti, condrociti, mioblasti, preadipociti ed altri ancora - che si differenziano dal mesenchima. Le potenziali applicazioni cliniche sono quelle legate alla terapia cellulare per la rigenerazione ed il recupero funzionale dell'osso, della cartilagine e del muscolo. È chiaro che patologie (ereditarie o traumatiche) quali la osteoporosi, la osteoartrite, l'infarto, l'obesità, traumi di ossa e tendini trovano un ulteriore scenario di trattamento. Attività principale della Neurotech è la identificazione ed il prelievo di SC neuronali dal cervello di adulti umani per la loro espansione in coltura (ottenibile con l'aggiunta di Epidermal Growth Factor, basic Fibroblast Growth Factor e Leukaemia Inhibitory Factor al terreno di coltura). Emerge chiaro da questi due esempi l'apporto delle imprese BioTec alla ricerca di base. Di necessità, per una efficace competizione commerciale con le altre imprese, ciascuna di esse è tesa all'avanzamento delle conoscenze di base sul differenziamento (e, seppure oggi ancora limitatamente, alla creazione di nuovi posti di lavoro) poiché l'identificazione dei fattori che più efficacemente stimolano la riprogrammazione è in grado di determinare il successo commerciale della impresa. È ragionevole attendersi

un avanzamento rapido delle conoscenze dei fattori che specificano funzionalmente le SC e che compaiono nel corso della riprogrammazione del nucleo somatico, ad oggi scarsamente conosciuti; tra i pochi noti, l'espressione della fosfatasi alcalina, del fattore di crescita GDF-3, di trascrizione OCT-4, di repressione Genesis, la comparsa delle proteine del gruppo Polycomb e di quelle capaci di legare le isole CpG metilate.

L'attenzione del grande pubblico è certamente rivolta alle possibili applicazioni terapeutiche delle SC. Ma per la comunità scientifica queste applicazioni sono solo una delle tante opportunità offerte da queste cellule che in realtà costituiscono un reagente biologico di straordinaria importanza per la ricerca biomedica. Varie sono le aree della ricerca ove le SC, in particolare le ES, possono essere impiegate. Tra le più promettenti, quelle legate allo studio di:

- proprietà farmacologiche di nuove molecole e tossicità di nuovi farmaci;
- effetti di anomalie cromosomiche sullo sviluppo embrionale e fetale;
- organi artificiali (rene, fegato, cuore, denti, vasi);
- nuovi vettori utili per terapie geniche; ad esempio le SC possono essere impiegate per il trasferimento di geni nelle terapie antitumorali o come "proiettili" contro particolari tipi di cellule cancerose;
- fattori microambientali che consentono il mantenimento delle capacità staminali;
- molecole legate alla espressione dei geni nel corso del differenziamento cellulare (o anche nel dedifferenziamento delle cellule tumorali);
- riprogrammazione genetica delle cellule differenziate in SC (sviluppo di citoplasti artificiali e naturali);
- fattori responsabili per la attrazione delle SC nel sito tissutale danneggiato;
- ingegnerizzazione genetica al fine di evitare la reazione immunitaria.

Non tutti i paesi sono dotati di una legislazione tale da permettere studi su ES umane. Sotto questo profilo il pianeta è praticamente diviso in due.

Questo campo di ricerca di estrema avanguardia, ed i cui risultati permetterebbero certamente di abbreviare enormemente i tempi di passaggio dalla ricerca di base alla terapia, è di fatto in mano alle capacità di Regno Unito, Singapore, Israele e Sud Corea. Ora un referendum popolare ha aperto le porte a queste ricerche anche in Svizzera e California e la recente legislazione introdotta in Brasile farà di questo paese uno dei leader in questo campo di ricerca.

Se è chiaro che la medicina del nuovo secolo sarà una medicina rigenerativa che farà ampio uso di SC, meno chiaro è il reale quadro delle sorgenti di SC e quali ricerche si stanno mettendo in campo non per il domani, ma per un tempo più in là a venire. La ricerca ci propone quasi quotidianamente risultati che i media propongono in termini trionfalistici ed insieme forieri di gravissimi pericoli. Raramente si tenta di spiegare ai cittadini la reale situazione, senza creare false aspettative o creare timori che spingono i decisori politici a chiusure del quadro giuridico di ciò che è lecito ricercare. Il dibattito che si sta svolgendo a livello internazionale sulle SC è un dibattito "falsato": chiara è la evidenza delle possibilità di terapie che però sono ritenute lecite o illecite in base a convinzioni ideologiche e religiose sulla natura dell'embrione. Ne deriva per molti paesi una giu-

risprudenza che limita la capacità del capitale umano impegnato in ricerche di avanguardia che possono portare ad abbreviare i tempi delle applicazioni. E così il dibattito si arena su un tema che non può avere soluzioni. Il metodo scientifico potrebbe aiutare la dove dice che è necessario decidere in base al “che fare” degli embrioni che già esistono. L’adozione di una etica della responsabilità, della decisione, nei confronti di questi embrioni che già esistono porta alla inevitabile conclusione che è una maggiore forma di rispetto il loro impiego e non la loro distruzione. Come è stato deciso nel Regno Unito: i media hanno però presentato il via libera alla clonazione terapeutica in questo paese senza ricordare che le cellule uovo da cui sono stati derivati gli embrioni per preparare linee staminali erano oociti destinati alla distruzione. Il legislatore britannico ha ritenuto una forma di maggiore rispetto il loro impiego, e non la loro distruzione.

È necessario che la società civile sia in grado di espandere la propria capacità di comprensione delle opportunità e dei limiti intrinseci alla biologia delle SC. Solo così si potrà raggiungere una più diffusa conoscenza del mondo della ricerca delle SC ed una corretta percezione delle problematiche in campo, senza confondere i fatti scientifici con le fantasie, le paure, gli apriori ideologici e le irrazionalità. Ciò aiuterà i decisori politici a capire ed a sviluppare norme e regole rispettose delle attese dei cittadini: in primo luogo la attesa di vedere ben finanziata la ricerca in questo campo.

Va infatti sottolineato che la biologia delle SC è ancora un grande buco nero del quale incominciamo ad intravedere solo alcune realtà. In un simile contesto è dunque necessaria tanta, e ben finanziata, ricerca per sviluppare strategie tese all’ottenimento di grandi quantità di diversi tipi di SC. L’esempio, già ricordato, della ricerca preclinica sul Parkinson è esemplificativo: ad oggi ben 487 pazienti parkinsoniani sono stati trattati con SC nervose derivate da materiale abortivo fetale, e quindi con SSC. Solo 3 pazienti non hanno mostrato regressione dei sintomi, 484 hanno visto scomparire discinesia ed ancora oggi dopo 3- 5 anni le SSC trapiantate sono capaci di produrre dopamina (la sostanza mancante nel cervello dei pazienti Parkinson). Purtroppo questo approccio terapeutico è del tutto impraticabile su larga scala poiché è necessario il materiale derivante da 5- 6 aborti per ottenere la quantità di SC necessaria al trattamento di un solo paziente Parkinson. Da qui la necessità di trovare nuove sorgenti del reagente biologico utile al trattamento: Tiziano Barberi, nell’agosto 2004, ha ottenuto un milione di neuroni dopaminergici da una singola ES umana. È chiaro che solo un atteggiamento criticamente aperto permetterebbe di svolgere queste ricerche in modo sistematico per stabilire così se questa opportunità terapeutica è praticabile su larga scala e non solo in studi mirati per pochi pazienti.

L’atteggiamento intellettuale del ricercatore è intrinsecamente un atteggiamento a-confessionale e anti-fondamentalista, in una parola è un atteggiamento genericamente (e necessariamente se vuole dirsi seguace del metodo scientifico galileano) di laicità. Laicità intesa come atteggiamento intellettualmente aperto, aperto ai cambiamenti concettuali che i dati di nuove sperimentazioni lo portano a compiere. Anche a cambiare radicalmente idea rispetto a posizioni iniziali sulle quali si è basato per concepire un esperimento che ha prodotto dati non congrui

con la propria posizione iniziale. Il ricercatore sottopone a costante revisione le proprie conoscenze e, se vuole essere un buon ricercatore, con mente aperta accetta anche i dati che gli dimostrano come si fosse sbagliato a dedurre una certa idea, a sviluppare un concetto. Per poter svolgere degnamente questo lavoro il ricercatore deve essere libero: idealmente deve essere libero da vincoli economici e libero da norme giuridiche che ne indirizzino il lavoro. Purtroppo questa condizione ideale non si realizza nella ricerca sulle SC, certamente non si realizza nel nostro paese. Vero è che anche in altri paesi (ad esempio USA e Germania) esistono vincoli alla ricerca sulle ES. È altrettanto vero però che in questi paesi le dinamiche sociali esistenti mettono in campo correttivi tali da ripristinare una situazione di sostanziale sostegno alla ricerca sulle ES, basti pensare al referendum popolare con cui la California, ma anche la Svizzera, ha stabilito di dare il via libera alla ricerca sulle ES con un investimento altissimo (seguita ormai da molti altri stati della federazione).

A livello internazionale (e senza voler fare una difesa della categoria) la comunità scientifica dei biologi dello sviluppo che hanno partecipato attivamente alle ricerche ed al dibattito (a partire dalle prospettive conoscitive e applicative conseguenti al successo della tecnica del trasferimento nucleare nei mammiferi) sulla derivazione e coltivazione delle ES, ha mantenuto un atteggiamento di laicità. Anche i biologi impegnati nelle ricerche con SC adulte hanno sempre sottolineato l'importanza di finanziare le ricerche sulle ES. Qualche eccezione vi è stata, ma certamente si tratta di piccoli peccati veniali dettati dall'esigenza di reperire fondi, ma il quadro delineato non cambia sostanzialmente.

Il campo della biologia delle SC avrebbe molto da guadagnare se si lasciasse pari opportunità di ricerca alle due strategie, se si desse loro la stessa libertà di conoscenza, cioè dare loro la possibilità di creare *nuova* conoscenza per stabilire, ad esempio, se una data patologia sarà meglio trattabile con un tipo o con l'altro di staminale. Al contrario, molto spesso, credenze private di alcuni decisori politici vengono contrabbandate per conoscenze scientifiche. Va inoltre sottolineato che in Italia anche la ricerca sulle SSC è finanziata in modo vergognoso: con l'equivalente del biglietto della lotteria di capodanno (5 milioni di Euro)! Mentre la "laica" Spagna investe 100 milioni di Euro per la ricerca sulle SSC per un solo istituto, il Carlos III di Madrid ed apre ben due parchi biotecnologici (Barcellona e Valencia) al lavoro sulle ES.

Un esempio di corretta procedura, un esempio chiaro di laicità e di democrazia, è quello messo in campo dal governo del Regno Unito dove il primo ministro Tony Blair ha investito milioni di sterline per divulgare e spiegare a tutti i cittadini "il libro bianco della genetica nel sistema sanitario nazionale" (*Our Inheritance, Our Future: Realising the potential of genetics in the NHS*). Le mamme negli asili, i lavoratori nelle pause pranzo, le varie comunità etniche, tutti i cittadini hanno incontrato specialisti che illustravano loro i contenuti del libro, cosa significa concretamente la "clonazione terapeutica e riproduttiva", la costruzione di una "biobanca di dati genetici", la "selezione del sesso" e così via tutte le opportunità offerte oggi dalla "rivoluzione biologica" che stiamo vivendo dopo i sequenziamenti dei genomi, quello umano in primis. Solo così è possibile rea-

lizzare un controllo democratico nell'elaborazione di principi e norme giuridiche che regolamentino la ricerca, e le trasposizioni tecniche degli avanzamenti del sapere, in modo rispettoso della pluralità di valori. Sarà il sostegno dei cittadini informati e capaci di elaborare in piena autonomia le proprie scelte bioesistenziali (inizio e fine vita, ad esempio) quello che assicurerà di realizzare quella che Pietro Greco chiama "democrazia cognitiva" e che può ben essere vista come la necessaria base per costruire una società davvero laica.

I temi ed i problemi legati alla diffusione delle biotecnologie biomediche nel dibattito in ambito sociologico sulla percezione pubblica delle biotecnologie e sui fattori che influenzano la percezione dei rischi e i giudizi morali nei riguardi delle diverse applicazioni delle biotecnologie richiedono una riflessione sia in chiave storica sia a livello di dinamiche culturali e socio-economiche. Il ruolo della comunicazione scientifica e degli scienziati nel modulare tali atteggiamenti ed in particolare le aspettative individuali e sociali riguardo alle applicazioni delle SC risulta imprescindibile.

La storia della scienza insegna che non esistono scorciatoie; non è fruttuoso pensare di investire in ricerca applicata se in precedenza non si finanzia quella di base, non è fruttuoso l'atteggiamento anti-laico nei confronti della conoscenza. Il che significa finanziare (libertà) tutte le opzioni della ricerca (conoscenza). La non-laicità può solo portare al declino, culturale ed economico poiché dalla conoscenza (che avanza solo con un atteggiamento laico da parte delle istituzioni) oggi dipende il motore economico delle società.

Bibliografia essenziale

1. Stem Cells. Nature Vol 441, Issue no. 7097; 29 June 2006.
2. Boiani M, Scholer HR. Regulatory networks in embryo derived pluripotent stem cells. 3. Nature Reviews Molecular Cell Biology - AOP, 14 October 2005; doi: 10.1038.
3. Ivanova N. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. Nature, 442; 3 August 2006; doi:10.1038.
4. Klimanskaya I, et al. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. Nature Vol 444; 23 November 2006; doi: 10.1038.
5. MacLaren RE, et al. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. Nature Vol 444; 9 November 2006; doi: 10.1038.
6. Sampaolesi M, et al. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. Nature, 444/16 November 2006; doi: 10.1038.
7. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126, 663-676, August 25, 2006.

Riprogrammazione nucleare, cellulare e plasticità differenziativa

Maurizio Zuccotti¹, Silvia Garagna², CarloAlberto Redi^{2,3}

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Istologia ed Embriologia, Università di Parma;

²Dipartimento di Biologia Animale, Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Università di Pavia;

³Direzione Scientifica Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Il nostro corpo risulta composto da circa 1000 miliardi di cellule, diverse tra loro, a comporre i vari tessuti ed organi. Nel corso dello sviluppo embrionale e fetale le cellule che si vanno formando si differenziano acquisendo le caratteristiche specifiche dei vari tessuti. Molte delle patologie che affliggono l'umanità sono dovute alla morte (per senescenza, trauma, azione di agenti tossici) delle cellule che costituiscono i tessuti. È chiaro che se si potesse disporre di cellule capaci di rigenerare o sostituire quelle perse o danneggiate, la medicina potrebbe fare uso di terapie cellulari per guarire o migliorare la qualità della vita dei pazienti. Per la medicina del futuro sarà determinante sviluppare strategie tese all'ottenimento di cellule da impiegarsi per terapie cellulari in medicina rigenerativa.

Le cellule staminali vengono classificate, in base al loro grado di differenziamento, in cellule staminali totipotenti, pluripotenti, multipotenti e unipotenti. La cellula staminale totipotente per eccellenza è lo zigote dal quale derivano tutte le cellule dell'organismo; le cellule staminali pluripotenti sono quelle del nodo embrionale da cui deriverà l'embrione vero e proprio (se isolate e coltivate in vitro queste cellule daranno origine a colonie cellulari di cellule embrionali staminali - dette cellule ES) e le cellule germinali embrionali (cellule EG); le cellule staminali multipotenti sono quelle dei tre foglietti embrionali (l'ectoderma, il mesoderma e l'endoderma); le cellule staminali unipotenti sono quelle presenti nei diversi distretti tissutali dell'individuo adulto e nell'organismo si differenziano in un unico tipo cellulare, assicurando il rinnovo dei tessuti che compongono i vari organi. In questo articolo descriveremo le diverse strategie adottate per ottenere cellule staminali pluripotenti.

Riprogrammazione nucleare

Numerose evidenze sperimentali dimostrano che nei Mammiferi il processo di riprogrammazione funzionale del nucleo di una cellula somatica terminalmente differenziata è possibile (Wakayama et al., 1998; Wilmut et al., 1997).

A fronte di una evidente opportunità di promuovere una riprogrammazione funzionale, tale riprogrammazione avviene nella maggior parte dei casi in modo aberrante o incompleto, le rese di sviluppo embrionale preimpianto e postimpianto sono basse e alto è il tasso di mortalità perinatale e di incidenza di patologie sistemiche negli individui ottenuti per clonazione (Jouneau et al., 2003).

Il nucleo di una cellula somatica terminalmente differenziata si trova all'improvviso in un contesto citoplasmatico diverso: nell'embrione di topo nel corso delle prime 24/32 ore dalla fecondazione vengono innescati diversi meccanismi molecolari di attivazione e di regolazione dell'espressione genica la cui riuscita rappresenta una condizione necessaria per lo sviluppo embrionale successivo (Schultz et al., 1999).

Non solo quindi devono essere azzerate quelle caratteristiche epigenetiche proprie del contesto cellulare da cui deriva la cellula somatica donatrice, ma devono esserne stabilite di nuove necessarie per il completamento dello sviluppo embrionale preimpianto e postimpianto.

La nostra conoscenza degli eventi molecolari responsabili di un corretto sviluppo embrionale preimpianto è ancora molto scarsa e la comprensione delle anomalie che si riscontrano nello sviluppo degli embrioni ottenuti per trasferimento nucleare è per questo motivo molto ardua. Le informazioni fino a oggi disponibili su questo versante riguardano uno spettro molto ridotto di eventi molecolari. Alcuni studi recenti mostrano negli embrioni clonati una alterata espressione genica sia nel corso dello sviluppo preimpianto (Wrenzycki et al., 2001; Boiani et al., 2002; Bortvin et al., 2003), che nel corso dello sviluppo postimpianto (Humphreys et al., 2002). L'alterata espressione genica risulta essere sia quantitativa che stadio di sviluppo e linea cellulare specifica, con una scorretta localizzazione del prodotto di trascrizione (Boiani et al., 2002).

Analisi dell'espressione genica in embrioni preimpianto di topo ottenuti per trasferimento nucleare

In un nostro recente lavoro, abbiamo confrontato i profili quantitativi dell'espressione genica di embrioni di controllo ottenuti per IVF con quelli di embrioni ottenuti per trasferimento nucleare (NT) e abbiamo correlato l'espressione genica degli embrioni NT con la competenza allo sviluppo preimpianto.

L'analisi quantitativa dell'espressione è stata condotta su diversi geni scelti per il ruolo chiave che svolgono in alcuni processi importanti nel corso delle prime fasi dello sviluppo preimpianto di topo: inattivazione del cromosoma X (*Hprt*, *Tsx*, *Bex-1*), apoptosi (*Bax*), metabolismo degli acidi grassi (*Cpt-2*) mantenimento della pluripotenza (*Oct-4*, *Bex-1*).

L'analisi dell'espressione genica è stata eseguita impiegando una RT-PCR sensibile alla singola cellula messa a punto nel nostro laboratorio (Sebastiano et al., 2003). La figura 1 mostra i risultati dell'analisi quantitativa dell'espressione genica nell'embrione preimpianto, mettendo in evidenza:

- 1) il profilo di espressione per ciascun gene lungo l'intero sviluppo preimpianto degli embrioni ottenuti per IVF e di quelli ottenuti per NT;

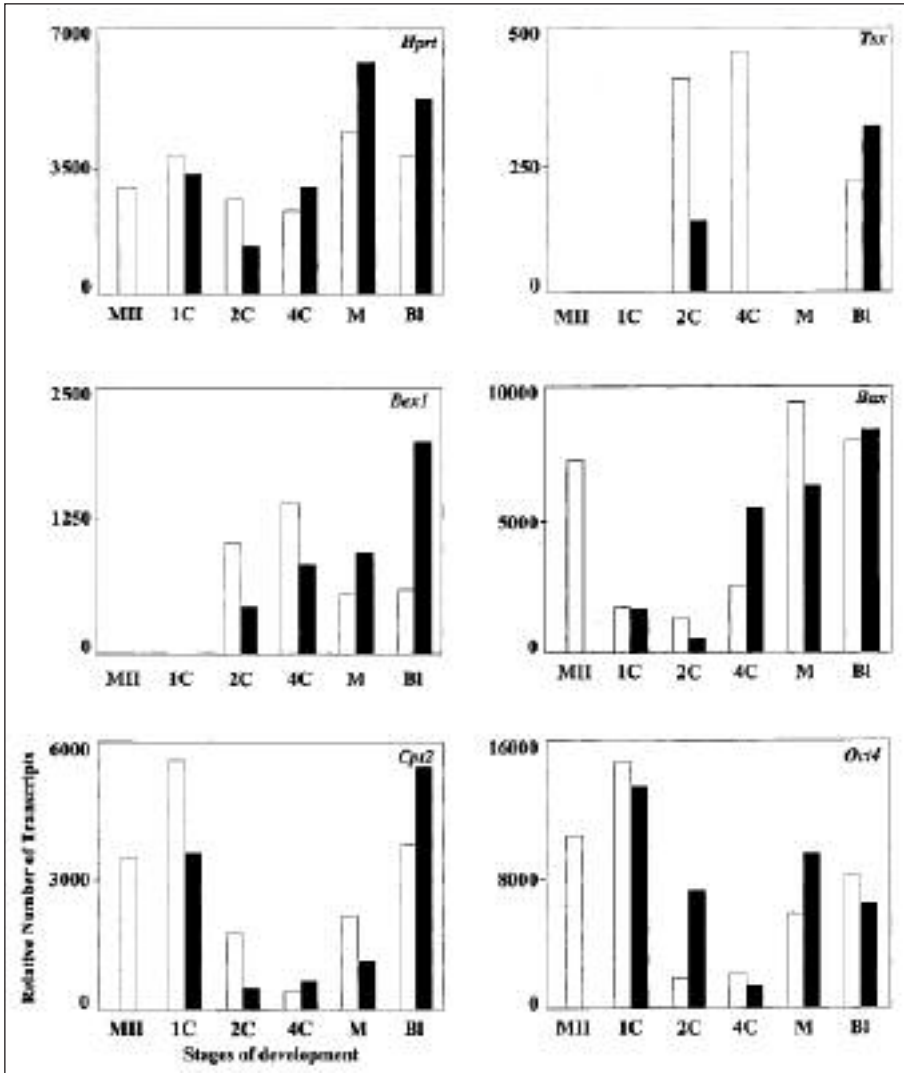


Fig. 1

2) il profilo di espressione per ciascun stadio di sviluppo nel confronto tra ciascun singolo embrione NT con la media dei campioni IVF.

Il confronto lungo l'intero sviluppo embrionale preimpianto (Figura 2) mostra come per tutti i geni analizzati il profilo di espressione genica degli embrioni NT risulti essere molto simile a quello degli embrioni IVF con differenze riscontrabili nella quantità totale di trascritto.

Dal confronto tra i profili di espressione genica lungo l'intero sviluppo embrionale preimpianto, emerge una sostanziale similitudine tra i due tipi embrionali con differenze evidenti riscontrabili nella quantità media di trascritti.

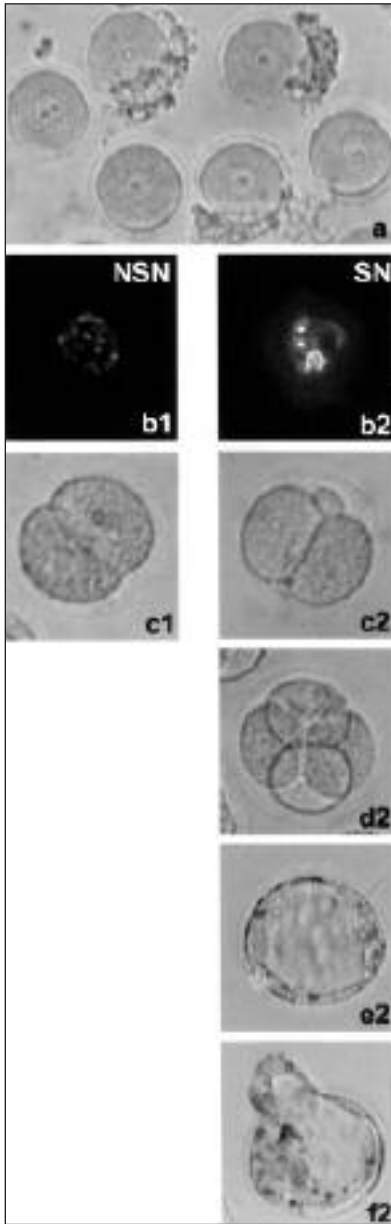


Fig. 2

Le differenze che si osservano tra i due tipi embrionali riguardano la quantità totale di trascritto.

Il processo di riprogrammazione del nucleo somatico anche se iniziato risulta essere incompleto o aberrante poiché i livelli di espressione genica che ne conseguono risultano quantitativamente alterati.

I processi di attivazione della trascrizione genica e di omeostasi della quantità assoluta di trascritto sono finemente regolati nel corso dell'intero sviluppo embrionale preimpianto da meccanismi diversi; i trascritti di origine materna, accumulati dall'ovocita nel corso della follicologenesi, subiscono, a partire dalla ripresa della meiosi fino allo stadio di 8 cellule, un attivo processo di degradazione (Piko and Clegg, 1982).

L'attivazione del genoma embrionale viene inoltre finemente regolata nelle prime 24 ore successive alla fecondazione: una prima debole ondata di trascrizione si osserva a carico del pronucleo paterno, poche ore dopo l'ingresso dello spermatozoo nell'ovocita, una seconda attività trascrizionale (molto più intensa) avviene allo stadio di 2 cellule (Schultz et al., 1999; Nothias et al., 1995).

I risultati da noi ottenuti mostrano come nelle prime 24 ore trascorse dall'attivazione degli embrioni ricostituiti quei meccanismi molecolari responsabili della riprogrammazione del nucleo somatico abbiano già iniziato ad agire in tutti gli embrioni.

Tale riprogrammazione consiste non solo nella rimodulazione delle caratteristiche epigenetiche del nucleo somatico, ma anche nella corretta attivazione temporale di tutti quei geni che normalmente vengono trascritti negli embrioni di controllo. Gli embrioni NT in altre parole mostrano delle dinamiche di regolazione dell'espressione genica (intese come attivazione della trascrizione e/o degradazione del trascritto) simili a quelle degli embrioni IVF.

Identificazione ed analisi dei processi molecolari che regolano la riprogrammazione genetica

Gli esperimenti di trasferimento nucleare hanno quindi dimostrato che l'oocita enucleato è in grado di riprogrammare geneticamente il nucleo di una cellula somatica terminalmente differenziata. Ad oggi però non conosciamo nulla di quali possano essere i meccanismi molecolari coinvolti in questo processo. Dagli esperimenti condotti sul topo, sappiamo che la riprogrammazione è un processo che inizia già nelle fasi immediatamente successive al trasferimento nucleare e quando l'embrione ha raggiunto lo stadio di 2 cellule (24 ore dopo) il genoma è già in grado di esprimere geni che sono propri dell'embrione (geni zigotici) e che non vengono normalmente espressi dal nucleo somatico. Se i geni zigotici non venissero espressi correttamente, sia temporalmente che quantitativamente, l'embrione non sarebbe in grado di proseguire lo sviluppo e morirebbe. È quindi nelle prime ventiquattro ore di vita dell'embrione clonato che si gioca il suo futuro. Alcuni laboratori, incluso il nostro, stanno ora cercando di analizzare i meccanismi molecolari che intervengono proprio in questi primi momenti della vita dell'embrione clonato, confrontando il suo sviluppo con quello di un normale embrione. Nel normale sviluppo embrionale i più rilevanti cambiamenti che seguono la fecondazione avvengono sono a carico di componenti epigenetiche che regolano le funzioni del genoma. La metilazione del DNA, l'organizzazione della cromatina e l'architettura nucleare sono alcuni dei meccanismi epigenetici più studiati per comprendere i processi che regolano l'espressione del genoma.

Metilazione del DNA

Siti CpG di una sequenza genica possono essere coinvolti nel processo di regolazione della trascrizione di quel gene. La presenza di un gruppo metile ($-\text{CH}_3$) su una o più basi citosine può risultare determinante nell'inattivazione di un gene. Durante lo sviluppo embrionale preimpianto, il genoma inizialmente ipometilato, va incontro non solo ad un aumento della metilazione di citosine, ma ad una metilazione differenziata tra cellule che andranno a comporre il trofotoderma (da cui genereranno gli annessi extraembrionali) e quelle che formeranno il nodo embrionale (da cui si svilupperà l'embrione vero e proprio). La corretta esecuzione di questo processo di metilazione è fondamentale per un corretto proseguimento dello sviluppo post-impianto.

Organizzazione della cromatina

Pochi minuti dopo la penetrazione dello spermatozoo nella cellula uovo, i genomi di entrambi i gameti modificano l'organizzazione della loro cromatina che da una struttura tipica germinale (nello spermatozoo questa assume un livello di forte compattazione all'interno di un nucleo molto piccolo grazie alla presenza di proteine, le protamine, caratteristiche del gamete maschile che ne consentono l'impacchettamento) diventa di tipo embrionale. Si pensa che inizialmente tutti i blastomeri (le cellule che compongono l'embrione preimpianto) abbiano un profilo di metilazione e di organizzazione della cromatina simile tra di loro, ma che col procedere dello sviluppo e del differenziamento queste cambino nelle diverse cellule.

Architettura nucleare

Risale agli studi di Boveri, più di un secolo fa, l'idea che il nucleo avesse delle compartimentalizzazioni funzionali. Oggi sappiamo che il nucleo non è una scatola contenente materiale genetico (i cromosomi) con un ordine casuale. La posizione di un cromosoma, di una porzione di cromosoma, di gruppi di geni o di un singolo gene all'interno della sfera nucleare è regolatrice delle funzioni del genoma. Se sperimentalmente una porzione cromosomica contenente alcuni particolari geni viene spostata da un territorio nucleare ad un altro (Dernburg et al., 1996), l'effetto ottenuto è quello di modificare il profilo di espressione di quel gene fino, in alcuni casi, a bloccarne completamente la trascrizione.

Da questa breve trattazione di alcuni dei meccanismi epigenetici che regolano l'espressione genica di un genoma e quindi le sue funzioni, si comprende come il regolare procedere del ciclo o del differenziamento cellulare dipendano enormemente da un loro corretto assetto temporale e spaziale. Bastano poche basi citosine metilate in più o una cromatina più o meno condensata oppure uno scorretto posizionamento di un gruppo di geni nel nucleo per mettere a rischio il normale sviluppo di un embrione. Come mostrano gli esperimenti di trasferimento nucleare, il citoplasma dell'oocita è in grado di dedifferenziare un nucleo che era programmato per svolgere le funzioni di quella particolare cellula somatica, di guidarne poi il differenziamento fino, in alcuni casi, al completo sviluppo di un nuovo individuo. Mettendo a confronto i profili epigenetici e di espressione genica di embrioni ottenuti per fecondazione *in vitro* con quelli ottenuti da trasferimento nucleare, dovremmo essere in grado di cogliere quali sono i principali fenomeni che intervengono nella riorganizzazione del genoma.

Un altro aspetto di notevole importanza è la transpecificità di questi meccanismi coinvolti nella riprogrammazione nucleare. Infatti è stato dimostrato che oociti di bovino enucleati sono in grado di riprogrammare nuclei somatici di altre specie (Dominko et al., 1999) e di guidare lo sviluppo dell'embrione fino allo stadio di blastocisti. Questo significa anche che i meccanismi coinvolti nella regolazione dello sviluppo preimpianto sono conservati tra le diverse specie di mammiferi.

Il modello dell'oocita antrale

Un aiuto alla comprensione dei processi che intervengono durante la riprogrammazione del nucleo somatico potrebbe venire dal confronto tra l'attività di riprogrammazione di estratti cellulari ottenuti da oociti competenti o non competenti allo sviluppo embrionale. Studi recenti hanno evidenziato la presenza nel compartimento antrale dell'ovario di tipo di due tipi di oociti riconoscibili per una diversa organizzazione della cromatina. Un oocita che presenta un anello di cromatina positiva al fluorocromo Hoechst 33342 attorno al nucleolo (denominato *surrounded nucleolus oocyte*, SN) ed una cromatina filiforme e fortemente compatta; ed un altro tipo di oocita con cromatina finemente dispersa e senza un anello attorno al nucleolo (*Not Surrounded oocyte*, NSN) (Zuccotti et al., 1995). La differenza morfologica di questi due oociti ha un significato biologico in quanto solo l'oocita SN è in grado di sviluppo embrionale *in vitro* fino allo stadio di

blastocisti, mentre l'oozita NSN si ferma allo stadio di 2 cellule (Figura 2) (Zuccotti et al., 1998; 2002). Lo studio degli eventi citologici e molecolari che, ci si attende, possano avvenire in cellule somatiche coltivate in presenza di estratti cellulari isolati da oociti SN o NSN permetterebbe la messa a punto di un sistema *in vitro* in grado, attraverso la comparazione, di identificare i tempi, le modalità ed i meccanismi coinvolti nel processo di riprogrammazione.

Riprogrammazione cellulare

Gli esperimenti di riprogrammazione nucleare mostrano che, nonostante siamo in grado di osservare il processo di riprogrammazione nel modello rappresentato dall'oozita, molto poco è conosciuto dei meccanismi che regolano questi eventi. Se riuscissimo a comprendere quali sono i meccanismi e le molecole coinvolte nei processi di riprogrammazione genetica che avvengono all'interno dell'ooplasma, potremmo cercare di mimarli in una condizione sperimentale ricostruendo l'ambiente interno dell'oozita, in altre parole potremmo definire quelle che sono le componenti necessarie ad ottenere un citoplasto artificiale.

Nuove metodologie per ottenere un'efficiente riprogrammazione funzionale di un numero elevato di cellule somatiche in grado di superare le difficoltà associate al trasferimento nucleare, fanno ricorso al transdifferenziamento di cellule in coltura. Esperimenti di fusione cellulare hanno dimostrato che le cellule ES e le cellule germinali embrionali (EG) sono in grado di indurre processi di riprogrammazione cellulare (Tada et al., 2001; Terada et al., 2002; Ying et al., 2002). Altri studi hanno dimostrato la possibilità di ottenere transdifferenziamento in coltura: i mioblasti possono transdifferenziare in adipociti maturi se coltivati con fattori di trascrizione adipogenici (Hu et al., 1995); l'attivazione di fattori di trascrizione epatici in cellule pancreatiche può indurre la loro conversione in epatociti (Shen et al., 2000); il blocco delle giunzioni occludenti di osteoblasti in coltura determina il loro differenziamento fenotipico in adipociti (Schiller et al., 2001); nel ratto, cellule endoteliali del cordone ombelicale fetale o neonatale sono in grado di transdifferenziare in cardiomiociti quando co-coltivate con cardiomiociti neonatali (Condorelli et al., 2001). Alcuni recenti lavori hanno rappresentato un momento di svolta nella ricerca riguardante il processo di transdifferenziamento cellulare (Hakelien et al., 2002, 2004; Landsverk et al., 2002; Gaustad et al., 2004). Estratti citoplasmatici isolati da diversi tipi di cellule somatiche hanno indotto una riprogrammazione dell'espressione genica di altri tipi di cellule somatiche o di nuclei isolati. Fibroblasti coltivati in presenza di estratti di linfociti T umani o di una linea linfocitaria trasformata esprimevano geni specifici della linea linfocitaria e l'espressione di antigeni specifici delle cellule T. Fibroblasti coltivati in presenza di estratti cellulari di precursori neuronali sintetizzavano le proteine dei neurofilamenti e mostravano una crescita di tipo dendritico. Cellule staminali umane ottenute dal tessuto adiposo coltivate in presenza di estratti di cardiomiociti di ratto hanno assunto caratteristiche funzionali tipiche dei cardiomiociti, indicando la possibilità di un'efficiente transdifferenziamento cellulare trans-specifico (Gastaud et al., 2004). Questa riprogrammazione funzio-

nale di cellule somatiche altamente differenziate, viene evidenziata anche dall'assorbimento e localizzazione nucleare di fattori di trascrizione, dall'attivazione di un complesso proteico coinvolto nel rimodellare la composizione della cromatina. Il processo di transdifferenziamento osservato coinvolge molti cambiamenti cellulari, tra cui modificazioni epigenetiche della metilazione del DNA, della organizzazione e della condensazione della cromatina che porta alla attivazione o alsilenziamento di specifici gruppi di geni. La riprogrammazione funzionale così ottenuta si è dimostrata stabile nelle molte divisioni cellulari successive e per diverse settimane di coltura (Hakelien et al., 2002, 2004; Hakelien and Collas, 2002; Landsverk et al., 2002). Questi risultati dimostrano l'esistenza di una dominanza molecolare di un certo tipo cellulare su un altro, avendo come risultato la trasformazione del tipo cellulare suscettibile nel tipo cellulare dominante. L'impiego di estratti cellulari per l'ottenimento di grandi quantità di cellule transdifferenziate sembra essere molto promettente e potrebbe costituire un ottimo modello di studio per l'analisi degli eventi della riprogrammazione cellulare in vitro.

Attivazione di marcatori della pluripotenza cellulare da parte di fibroblasti coltivati in estratti di cellule embrionali staminali

Nel nostro laboratorio abbiamo di recente cercato di indurre riprogrammazione genetica in fibroblasti fetali coltivandoli in estratti ottenuti da cellule embrionali staminali (ES).

I risultati mostrano come un piccolo numero di fibroblasti (cellule terminalmente differenziate) siano indotti ad esprimere marcatori tipici delle cellule ES, marcatori che normalmente non esprimono mai. La membrana cellulare dei fibroblasti è stata prima permeabilizzata, coltivando le cellule in streptolisina O, poi le cellule sono state coltivate per un periodo di circa 12 settimane in un terreno di coltura normalmente impiegato per le cellule ES, contenente fattori in grado di sostenere la pluripotenzialità delle cellule. In queste condizioni sperimentali, alcuni fibroblasti (~ 200-300 su una popolazione di fibroblasti di ~ 700.000) sono indotti ad esprimere il gene Oct-4 e l'enzima fosfatasi alcalina caratteristici delle cellule ES.

Cellule pluripotenti isolate direttamente dall'organismo: la plasticità differenziativa

Uno dei dogmi centrali della biologia dello sviluppo sostiene che successivamente alla formazione dello zigote, la potenzialità differenziativa delle cellule va, a mano a mano che lo sviluppo procede, restringendosi. Cellule staminali totipotenti persistono fino allo stadio di morula dello sviluppo preimpianto. Le cellule staminali pluripotenti, localizzate nella massa cellulare della blastocisti, possono differenziarsi nelle cellule che costituiscono i tre foglietti embrionali. Le cellule staminali multipotenti compaiono dopo la gastrulazione con la formazione dei tre foglietti embrionali (ecoderma, mesoderma e endoderma). A differenza delle cellule pluripotenti, quelle multipotenti sono capaci di differenziarsi solo in alcune

linee cellulari tessuto-specifiche. Nei tessuti dell'individuo adulto troviamo soprattutto cellule staminali unipotenti, cioè in grado di differenziarsi solamente lungo una specifica linea cellulare.

Questa idea del restringimento della capacità differenziativa delle cellule staminali è stata però messa alla prova da alcune recenti ricerche. Secondo alcuni ricercatori, cellule staminali di una particolare linea cellulare possono, in particolari condizioni sperimentali di coltura o dopo manipolazioni genetiche, differenziare in cellule di altre linee (per una review si veda Vieyra et al., 2005). Queste osservazioni hanno contribuito alla definizione del concetto di plasticità cellulare. Questo termine si riferisce all'abilità di una cellula di cambiare il proprio destino e differenziare in un altro tipo cellulare diverso dal tessuto nel quale normalmente risiede o dal quale deriva durante lo sviluppo embrionale. La questione se la condizione di plasticità sia presente anche in vivo durante le normali attività fisiologiche o di sviluppo è ancora oggetto di discussione e recenti studi in vivo hanno amplificato il dibattito. Queste ricerche hanno mostrato come cellule staminali derivate da un particolare tessuto sono capaci di innestarsi in tessuti di diversa origine embrionale e, in alcuni casi, contribuire alla loro rigenerazione. Ad esempio, cellule derivate dal midollo osseo sono in grado di contribuire alla rigenerazione del tessuto muscolare scheletrico, epatico e nervoso. Sebbene la frequenza e il meccanismo con cui questi fenomeni avvengono rimane ancora oggetto di controversie, la spiegazione di questa rigenerazione è stata attribuita, in un primo tempo, alla plasticità delle cellule staminali impiegate. Stimoli derivanti dal microambiente in cui vengono trasferite le cellule staminali potrebbero guidare il differenziamento e i programmi differenziativi di queste cellule. Queste osservazioni e ipotesi riguardanti la potenziale plasticità differenziativa delle cellule staminali adulte hanno stimolato la comunità scientifica soprattutto per le potenzialità applicative in campo biomedico, soprattutto nell'impiego di cellule staminali umane ed in particolare per quelle ematopoietiche, per le quali le tecniche di isolamento, coltura e trapianto sono sviluppate da molti anni.

Questi risultati hanno in qualche modo oscurato un poco le ricerche che nel frattempo venivano condotte impiegando cellule ES. Per queste cellule infatti esistono, oltre a problemi di carattere tecnico-scientifico, ben illustrati da altri colleghi in questo libro, anche aspetti di tipo etico che frenano sull'impiego di queste cellule staminali di derivazione umana.

Studi successivi hanno in qualche modo raffreddato l'iniziale entusiasmo. I risultati di queste ricerche hanno mostrato che in alcuni casi questo processo di transdifferenziazione poteva essere spiegato con un fenomeno di fusione cellulare delle cellule staminali ematopoietiche impiegate con quelle del tessuto nel quale sono state trapiantate.

Utilizzo delle cellule embrionali staminali: tuttora cronaca, non ancora storia

Il pionieristico lavoro di Till e McCullough (1961) sulle cellule staminali ematopoietiche del topo ha costituito senza dubbio la base di partenza per tutte le suc-

cessive strategie di ricerca sulle cellule staminali: esso indicò i paradigmi concettuali che ancora oggi la comunità scientifica impiega per progettare ricerche ed applicazioni cliniche. Si deve quindi alla grande tradizione degli studi ematologici (Little e Storb, 2002) l'aver indicato la strada che ha portato all'attuale enorme interesse per un possibile impiego terapeutico delle cellule staminali nella cura di un vasto spettro di patologie sulla base delle straordinarie potenzialità differenziali delle cellule staminali (Hennigson et al., 2003) isolate da adulto, da cordone ombelicale, da feto, da gonadi fetali (cellule embrionali germinali, EG) e dall'embrione preimpianto (cellule staminali embrionali, ES).

Le cellule staminali somatiche (i.e., non embrionali) già assicurano alcune importanti applicazioni, diffusamente trattate altrove in questo libro, per il trattamento di leucemie, dei grandi ustionati e della degenerazione della retina. Per la medicina (rigenerativa) del futuro sarà determinante lo sviluppo di strategie tese all'ottenimento di grandi quantità di cellule staminali da impiegarsi nella pratica clinica. Difficoltà di tipo tecnico (per il prelievo e per la espansione in coltura) per le staminali somatiche e di tipo tecnico ed etico per le ES e le EG costituiscono però dei limiti ad un più vasto impiego terapeutico delle cellule staminali. Sperimentazioni sono in corso per il trattamento del Parkinson, del diabete e dell'infarto del miocardio ed il trapianto di cellule staminali promette di uscire entro breve tempo dalla cronaca per passare alla pratica clinica routinaria.

Cronaca dei trapianti di ES

La storia dei successi nei trapianti di cellule staminali ematopoietiche (Little e Storb, 2002; Pession et al., 2000) è alla base delle strategie oggi sviluppate per le terapie basate sui trapianti di cellule ES (Hennigson et al., 2003). Va precisato che ad oggi non esistono pratiche terapeutiche di routine basate sull'impiego di cellule ES; il loro impiego è ancora del tutto legato alla ricerca anche se la analisi della letteratura scientifica permette di vedere più vicine nel tempo alcune applicazioni delle terapie basate su trapianti di cellule ES rispetto ad altre. Tra queste si possono segnalare quelle per il trattamento del diabete, del Parkinson e dell'infarto miocardico; altre sporadiche applicazioni si stanno proponendo. Indubbiamente le cellule ES possiedono caratteristiche, quali la pluripotenza e la capacità proliferativa illimitata, che le rendono estremamente attraenti per le terapie cellulari, anche se ad oggi le terapie con cellule ES restano limitate al campo della sperimentazione, soprattutto perchè solo pochi laboratori hanno accesso a cellule umane ES (Tab. 1). Per tradurre in pratica clinica il trapianto di cellule ES è ancora necessario identificare gli stadi ottimali della differenziazione cellulare per il trapianto e dimostrare che le cellule ES trapiantate si integrano, sopravvivono e funzionano nel ricevente.

Diabete

La capacità di coltivare cellule pancreatiche da linee ES promette grandi speranze per il fatto che queste cellule possono essere geneticamente modificate in modo tale da evadere la reazione immunitaria (Odorico et al., 2001). Ad un livello operativo resta la difficoltà di ottenere una popolazione pura di cellule insulina-secer-

nenti da una popolazione mista iniziale (le attuali rese sono nell'ordine dello 0.1%-0.5%) (Soria et al., 2000). Il metodo attualmente impiegato prevede che le cellule ES siano transfettate con un costrutto chimerico contenente la regione regolatrice del gene per la insulina accoppiato al gene per la resistenza alla neomicina ed il successivo isolamento delle cellule neomicina-resistenti. Queste cellule, se coltivate in bassa concentrazione di glucosio, vanno incontro a differenziazione e diventano capaci di rispondere a variazioni nella concentrazione di glucosio con un aumento sino a sette volte nella quantità di insulina secreta. Se impiantate nella milza di topi resi farmacologicamente diabetici per trattamento con streptozotocina, queste cellule sono in grado di riportare i valori ematici di glucosio a livelli normali (Soria et al., 2001). Recentemente è stato dimostrato che cellule umane ES possono essere coltivate a formare corpi embrioidi che contengono tra 1%-3% di cellule beta che spontaneamente esprimono il gene PDX-1, che controlla la trascrizione di insulina, ed i geni delle glucochinasi specifiche delle beta cellule (Assady et al., 2001); a giudizio degli autori, un miglioramento delle condizioni di coltura delle cellule ES porterà alla differenziazione di isolotti pancreatici.

Parkinson

Per fare chiarezza tra i sogni e la realtà promessi dalle terapie basate sull'impiego di cellule staminali neuronali per trattare i disordini neurologici, il lettore potrà riferirsi all'eshaustivo lavoro di Ferdinando Rossi e Elena Cattaneo (2002) dove vengono chiarite le problematiche scientifiche, e sono molte, ancora da affrontarsi per tradurre in realtà ciò che oggi è solo ipotizzabile. Come risulta evidente, ben diverso è impiegare il trapianto per rimpiazzare uno specifico tipo di neurone in una area cerebrale (i.e., Parkinson) o per ricollegare fibre nervose (i.e. traumi spinali). In altre parole, se per alcune applicazioni (Parkinson) è ragionevole ritenere che il disporre del tipo cellulare desiderato sia una ottima premessa per l'esito positivo della terapia (e quindi gli sforzi saranno nella direzione della produzione del tipo cellulare necessario grazie allo studio della manipolazione dei fattori intrinseci al genoma legati alla differenziazione del tipo cellulare da impiegarsi a partire da cellule progenitrici), per altre applicazioni (riparo dei traumi spinali) questo scenario deve essere arricchito dall'analisi dei fattori microambientali di nicchia, a livello della area danneggiata, capaci di promuovere l'integrazione delle cellule trapiantate in una architettura istologica che è prerequisito per il ristabilirsi delle funzioni. Non stupisce quindi che la sperimentazione più avanzata nel trattamento dei disordini neurologici con l'impiego di terapie cellulari sia per il Parkinson, dove si tenta di sostituire i neuroni dopaminergici persi in conseguenza del processo degenerativo. Diversi studi compiuti su modelli animali del Parkinson (Nishimura et al., 2003) e su pazienti (Lindvall, 2003) hanno dimostrato che questa è una buona strategia poichè i neuroni dopaminergici trapiantati riescono a rilasciare dopamina con un significativo miglioramento dei sintomi (tremori, rigidità e bradicinesia). Vi sono però diversi problemi legati all'uso di tessuto embrionale per i trapianti:

- 1) mancanza di quantità sufficienti di materiale da trapiantare per le necessità di tutti i pazienti;

- 2) grande variabilità dell'esito della terapia: ad oggi, più di 400 pazienti Parkinson hanno ricevuto trapianti di cellule staminali (Lindvall e Hagell, 2002; Linazasoro et al., 2003) con alcuni pazienti decisamente migliorati mentre altri non mostrano alcun significativo miglioramento;
- 3) comparsa di discinesia dopo il trapianto (15% dei pazienti in uno specifico studio) e necessità di meglio definire i criteri per la individuazione dei pazienti suscettibili di trapianto.

Nell'ambito dei problemi ora elencati, il secondo ed il terzo si riferiscono ad una controversia tra i sostenitori della efficacia dei trapianti e coloro che ritengono inefficaci tali pratiche. In realtà, questa controversia pare più basata sulla metodologia di raccolta ed interpretazione dei dati che non sull'esito cito-istologico del trapianto in sé (le immagini sono quanto mai chiare: i neuroni trapiantati attecchiscono e sono funzionalmente attivi). La controversia è stata innescata dai risultati del primo studio a doppio-cieco (Freed et al., 2001), certamente non incoraggianti, che mettevano in forte dubbio la validità di quelli delle prime sperimentazioni (non effettuati in doppio-cieco) non rivelando alcun significativo miglioramento dei sintomi del Parkinson ("primary end point" dello studio), anche se la tomografia ad emissione di positroni ben indicava che i neuroni dopaminergici trapiantati sono in grado di sopravvivere e crescere. Tra il grande pubblico ed anche tra i ricercatori prevale ancora questa sensazione di poco incoraggiante situazione. Ciò è anche dovuto alla poca risonanza data ai risultati della meta-analisi dei dati di Freed e collaboratori (Isacson et al., 2001) dove si dimostra che se si impiega la scala UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale) per monitorare la progressione della malattia dei pazienti dello studio a doppio-cieco e si considerano i risultati di tutte le sperimentazioni cliniche ad oggi compiute, l'interpretazione dei risultati ottenuti da Freed e collaboratori (Freed et al., 2001) è errata poiché:

- 1) impiegando la stessa scala di riferimento, UPDRS, la progressione del miglioramento della sintomatologia dei pazienti trattati da Freed e collaboratori si rivela paragonabile a quella delle altre sperimentazioni; inoltre, anche se la sperimentazione in doppio-cieco è stata fermata dopo un anno, la remissione della sintomatologia da parte dei pazienti è proseguita come accaduto nelle altre sperimentazioni;
- 2) i dosaggi dell'incorporazione di Fluoro-dopa rivelano che i neuroni dopaminergici trapiantati sopravvivono anche dopo un anno ed incorporano F-dopa ad un livello simile a quello dimostrato negli altri studi;
- 3) il fatto che il 15% dei pazienti nello studio di Freed e collaboratori abbia sviluppato discinesia, mentre questo effetto collaterale non si era rivelato in nessuno degli altri studi, è attribuibile ad una serie di varianti (chirurgiche, farmacologiche) specificatamente adottate;
- 4) la tecnica di preparazione delle cellule da trapiantare (obbligatoriamente imposta dalle regole dell'NIH statunitense che vieta l'uso di cellule ottenute da tessuto fresco ma impone un passaggio in coltura) potrebbe avere selezionato negativamente proprio quei neuroni dopaminergici che sono utili per il trattamento (ad oggi non esiste tecnica per distinguere tra i neuroni dopaminergici quelli utili per il trattamento del Parkinson).

Per quanto riguarda il primo dei problemi posti (da materiale abortivo non è possibile ricavare la quantità di staminali necessarie a tutti i pazienti), la capacità di differenziare neuroni dopaminergici perfettamente funzionali da staminali ES murine (Kim et al., 2002) apre nuovi scenari, anche se la possibile trasposizione a livello umano di questo risultato pone in campo i problemi di tipo etico sopra accennati.

Infarto del miocardio

Solo negli USA si registrano più di 400.000 casi di infarto del miocardio ogni anno, con un totale di circa sessanta milioni di persone affette da patologie cardiovascolari (circa otto nel nostro Paese) e, sebbene diverse cause contribuiscono a determinare un così elevato numero di pazienti (infezioni, ipertensione, patologie delle coronarie), per le patologie più gravi quali le insufficienze cardiache congestizie la prognosi assegna un'aspettativa media di vita di circa cinque anni (Dernburg et al., 1996). Il trapianto di cellule staminali autologhe presenta chiaramente dei grandi vantaggi rispetto al trapianto di cuore poichè ovvia alla mancanza di organi. Le cellule staminali ematopoietiche possono essere differenziate in cardiomiociti, cellule endoteliali dei vasi e cellule muscolari lisce che formano la parete dei vasi sanguigni grazie all'impiego di specifiche condizioni di coltura. Recentemente, Orlic e collaboratori (2001) hanno dimostrato che l'iniezione di cellule staminali ematopoietiche nella zona necrotica del cuore di topi porta alla formazione di nuovi cardiomiociti, endotelio vasale e cellule muscolari lisce; a nove giorni dal trapianto di cellule, la nuova porzione di miocardio (che comprende anche arterie coronariche e capillari) occupa circa il 70% della porzione di ventricolo danneggiata. Questi risultati suggeriscono la capacità da parte delle cellule staminali ematopoietiche di rispondere ai segnali fisiologici che provengono dal microambiente cardiaco, di migrare verso la porzione necrotica e di dar luogo alla formazione di cellule cardiache differenziate (Jackson et al., 2001). Quest'ultimo studio ha costituito la base del lavoro di Kocher et al. (2001), i quali hanno dimostrato che cellule staminali umane derivate dal midollo osseo, quando iniettate nel cuore di ratti infartati, sono state capaci di formare nuovi vasi sanguigni. Anche le cellule umane ES promettono di essere un buon reagente biologico per terapie cellulari cardiache: Itskovitz-Eldor et al. (2000) hanno dimostrato che cellule umane ES possono differenziarsi in coltura in cellule che esprimono diversi markers tipici delle cellule cardiache ed il gruppo di Kehat (Kehat et al., 2001) ha dimostrato che cellule umane ES possono differenziarsi in miociti con proprietà funzionali e strutturali simili a quelle dei cardiomiociti. Non vi è quindi dubbio che le cellule ES saranno utili nelle terapie cellulari per rigenerare il tessuto cardiaco danneggiato, anche se restano aperte molte questioni che riguardano sia il numero di cellule necessario per il trattamento sia la longevità delle cellule trapiantate. A queste domande alcuni recenti lavori paiono rispondere positivamente dimostrando la formazione in vitro di piccoli aggregati di cardiomiociti con contrazioni ritmiche da cellule umane ES (Lavone e Benvenisty, 2003; Nir et al., 2003) ed il completo recupero in ratti infartati delle normali attività funzionali cardiache per ben otto mesi dopo il trapianto di solo 300.000 cellule ES murine (Min et al., 2003).

Alcune sporadiche applicazioni riguardano la produzione di epatociti umani differenziati grazie all'impiego di butirrato di sodio da cellule ES con una resa del 10-15 % di cellule che esprimono proteine tipiche dell'epatocita (albumina, α -1-antitripsina, citocheratina 8 e 18), accumulano glicogeno ed hanno un'attività inducibile del citocromo P450 (Rambhatla et al., 2003). Anche la derivazione di cellule della tiroide è stata di recente ottenuta da Lin e collaboratori (2003) da cellule ES murine, mentre von Unge e collaboratori (2003) hanno ottenuto la cicatrizzazione di membrane timpaniche perforate nel gerbillo, sempre impiegando cellule ES.

Controllo della reazione immunitaria

Uso di farmaci immunosoppressivi

Il trapianto d'organo ha avuto successo anche grazie allo sviluppo di farmaci in grado di sopprimere o deprimere la risposta del sistema immunitario, che altrimenti determina una reazione di rigetto. Queste stesse molecole potrebbero essere impiegate per prevenire il rigetto di cellule o tessuti derivati dalle cellule ES. Purtroppo la somministrazione di questi farmaci spesso crea problemi di tossicità e di induzione tumorale.

Banche di cellule ES con un particolare MHC

Un altro possibile approccio per ridurre il rigetto da risposta immunitaria potrebbe essere quello di creare delle "banche" di linee cellulari ES umane nelle quali ciascuna linea rappresenti una combinazione unica di antigeni per il sistema maggiore di istocompatibilità (MHC). In questo modo, potrebbe risultare facile identificare una linea cellulare ES adatta ad un particolare paziente. Anche in questo caso il problema maggiore sarebbe quello di valutare il grado di compatibilità necessario e forse bisognerebbe avere a disposizione migliaia o addirittura milioni di linee cellulari ES per soddisfare tutti i possibili aplotipi MHC. Basti infatti ricordare che sino al 1997 il *National Marrow Donor Program* statunitense possedeva circa un milione di potenziali donatori di midollo osseo tipizzati sierologicamente per l'allele HLA-A, -B, -DR e questo campione non era in grado di coprire tutti i possibili pazienti, risultando compatibile con il 76% dei casi.

Manipolazione genetica di geni specifici

Le cellule ES potrebbero essere manipolate geneticamente per ridurre il fenomeno del rigetto. Un primo approccio potrebbe essere quello di eliminare il complesso MHC dalle cellule ES, ma questo si è rivelato poco efficace in fase sperimentale su cellule ES di topo. Infatti, trapianti di pelle in topi privi sia di MHC classe I che MHC di classe II sono stati rapidamente rigettati da trapiantati immunocompetenti (Grusby et al., 1993). Questo fenomeno sembrerebbe dovuto alla persistenza del cosiddetto rigetto mediato dall'allo-riconoscimento e stabilisce come la semplice eliminazione degli antigeni MHC del donatore non sia sufficiente a prevenire il rigetto. L'eliminazione mediante knock-out del gene MHC indesiderato e l'inserimento del gene MHC ottimale potrebbe essere un'alternativa.

tiva, apparentemente laboriosa, ma che grazie alla altissima plasticità posseduta dalle cellule ES permetterebbe di creare linee cellulari *ad hoc* adatte per ogni particolare paziente.

È importante sottolineare che l'impiego della tecnica di trasferimento di nuclei somatici (di fibroblasti) in oociti ha di recente permesso alla Advanced Cell Technology di produrre, nel bovino, tessuti istocompatibili per cuore, muscolo scheletrico e rene (Lanza et al., 2005).

Bibliografia

1. Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001; 50: 1691-1697.
2. Boiani M, Eckardt S, Scholer HR, McLaughlin KJ. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev.* 2002; 16: 1209-19.
3. Bortvin A, Eggan K, Skaletsky H, Akutsu H, Berry DL, Yanagimachi R, Page DC, Jaenisch R. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development.* 2003; 130: 1673-80.
4. Condorelli G, Borello U, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M, Galli R, Balconi G, Follenzi A, Frati G, Cusella De Angelis MG, Gioglio L, Amuchastegui S, Adorini L, Naldini L, Vescovi A, Dejana E, Cossu G. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10733-10738, 2001.
5. Dernburg AF, Broman KW, Fung JC, Marshall WF, Philips J, Agard DA, Sedat JW. Perturbation of nuclear architecture by long-distance chromosome interactions. *Cell* 85: 745-759, 1996.
6. Dominko T, Mitalipova M, Haley B, Beyhan Z, Memili E, McKusick B, First NL. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biology of Reproduction* 60: 1496-502, 1999.
7. Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001; 344: 710-719.
8. Gaustad KG, Boquest AC, Anderson BE, Gerdes AM, Collas P. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 420-427, 2004.
9. Grusby MJ, Auchincloss H Jr, Lee R, Johnson RS, Spencer JP, Zijlstra M, Jaenisch R, Papaioannou VE, Glimcher LH. Mice lacking major histocompatibility complex class I and class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 3913-3917.
10. Hakelien AM, Gaustad KG, Collas P. Transient alteration of cell fate using a nuclear and cytoplasmic extract of an insulinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 834-841, 2004.

11. Hakelien AM, Landsverk HB, Robl JM, Skalhegg BS, Collas P. Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. *Nat Biotechnol* 20: 460-466, 2002.
12. Hennigson CT, Stanislaus MA, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111 (2 Suppl): S745-S753.
13. Hu E, Tontonoz P, Spiegelman BM. Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9856- 9860, 1995.
14. Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Friedman A, Hochedlinger K, Yanagimachi R, Lander ES, Golub TR, Jaenisch R. Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 12889-94.
15. Isacson O, Bjorklund L, Sanchez-Pernaute R. Parkinson's disease: interpretations of transplantation study are erroneous. *Nat Neuroscience* 2001; 4: 553.
16. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 2000; 6: 88-95.
17. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stemcells. *J Clin Invest* 2001; 107: 1395-1402.
18. Jouneau A, Renard JP. Reprogramming in nuclear transfer. *Curr Opin Genet Dev*. 2003; 13: 486-91.
19. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001; 108: 407-414.
20. Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002; 418: 50-56.
21. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 7: 430-436.
22. Landsverk HB, Hakelien AM, Kuntziger T, Robl JM, Skalhegg BS, Collas P. Reprogrammed gene expression in a somatic cell-free extract. *EMBO Rep* 3: 384-389, 2002.
23. Lanza RP, Chung HY, Yoo JJ, Wettstein PJ, Blackwell C, Borson N et al. Generation of histocompatible tissues using nuclear transplantation. *Nat Biotechnology* 2002; 20: 689-696.
24. Lavon N, Benvenisty N. Differentiation and genetic manipulation of human embryonic stem cells and the analysis of the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13: 47-52.
25. Lin RY, Kubo A, Keller GM, Davies TF. Committing embryonic stem cells to differentiate into thyrocyte-like cells in vitro. *Endocrinology* 2003; 144: 2644-2649.

26. Linazasoro G. Stem cells: solution to the problem of transplants in Parkinson's disease? *Neurologia* 2003; 18: 74-100.
27. Lindvall O, Hagell P. Cell replacement therapy in human neurodegenerative disorders. *Cli Neurosci Res* 2002; 2: 86-92.
28. Lindvall O. Stem cells for cell therapy in Parkinson's disease. *Pharmacol Res* 2003; 47: 279-287.
29. Little MT, Storb R. History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 231-238.
30. Min JY, Yang Y, Sullivan MF, Ke Q, Converso KL, Chen Y, Morgan JP, Xiao YF. Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells. *J Thorac Cardiovasc Sur* 2003; 125: 361-369.
31. Nir SG, David R, Zaruba M, Franz WM, Itskovitz-Eldor J. Human embryonic stem cells for the cardiovascular repair. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 313-323.
32. Nishimura F, Yoshikawa M, Kanda S, Nonaka M, Yokota H, Shiroy A et al. Potential use of embryonic stem cells for the treatment of mouse parkinsonian models: improved behaviour by transplantation of in vitro differentiated dopaminergic neurons from embryonic stem cells. *Stem Cells* 2003; 21: 171-180.
33. Nothias JY, Majumder S, Kaneko KJ, DePamphilis ML. Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J Biol Chem.* 1995; 270: 22077-80.
34. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001; 19: 193-204.
35. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705.
36. Pession A, Rondelli R, Paolucci P, Pastore G, Dini G et al. Hematopoietic stem cell transplantation in childhood: report from the bone marrow transplantation group of the Associazione Italiana Ematologia Oncologica Pediatrica (AIEOP). *Hematologica* 2000; 85: 638-646.
37. Piko L, Clegg KB. Quantitative changes in total RNA, total poly(A), and ribosomes in early mouse embryos. *Dev Biol.* 1982; 89: 362-78.
38. Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, Peng Y, Carpenter MK. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant* 2003; 12: 1-11.
39. Rossi F, Cattaneo E. Neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. *Nat Rev Neuroscience* 2002; 3: 401-409.
40. Schiller PC, D'Ippolito G, Brambilla R, Roos BA, Howard GA. Inhibition of gap-junctional communication induces the trans-differentiation of osteoblasts to an adipocytic phenotype in vitro. *J Biol Chem* 276: 14133-14138, 2001.
41. Schultz RM, Davis W, Jr., Stein P, Svoboda P. Reprogramming of gene expression during preimplantation development. *J Exp Zool.* 1999; 285: 276-82.
42. Sebastiano V, Gentile L, Merico V, Manuela M, Zanoni M, Garagna S, Redi

- CA, Zuccotti M. A single cell sensitive RT-PCR for the study of gene expression in mouse preimplantation development. *Rend. Fis. Acc. Lincei*. 2003; 14: 117-126.
43. Shen CN, Slack JM, Tosh D. Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nat Cell Biol* 2: 879-87, 2000.
 44. Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig JA, Martin F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2000; 49: 157-162.
 45. Soria B, Skoudy A, Martin F. From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia* 2001; 44: 407-415.
 46. Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* 11: 1553-1558, 2001.
 47. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416: 542-545, 2002.
 48. Till JE, McCollough EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961 14: 213-222.
 49. Vieyra DS., Jackson KA, Goodell MA. Plasticity and tissue regenerative potential of bone marrow-derived cells. *Stem Cell Reviews* 1: 65-70, 2005.
 50. von Unge M, Dirckx JJ, Petri-Olivius P. Embryonic stem cells enhance the healing of tympanic membrane perforations. *Int J Pediatr Otorhinolaryng* 2003; 67: 215-219.
 51. Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*. 1998; 394: 369-74.
 52. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997; 385: 810-3.
 53. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997; 385: 810-3.
 54. Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, Miller A, Oliver J, Tervit R, Niemann H. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol Reprod*. 2001; 65: 309-17.
 55. Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416: 545-548, 2002.
 56. Zuccotti M., Giorgi Rossi P., Martinez A., Garagna S., Forabosco A., Redi C.A. Meiotic and developmental competence of mouse antral oocytes. *Biology of Reproduction*, 58, 700-704, 1998.
 57. Zuccotti M., Piccinelli A., Giorgi Rossi P., Garagna S., Redi C.A. Chromatin organisation during mouse oocyte growth. *Molecular Reproduction and Development* 41: 479-485, 1995.
 58. Zuccotti M., Ponce R.H., Boiani M., Guizzardi S., Govoni P., Scandroglio R, Garagna S., Redi C.A.. The analysis of chromatin organisation allows selection of mouse antral oocytes competent for development to blastocyst. *Zygote* 10: 73-78, 2002.

MICROAMBIENTE

Cellule staminali e loro nicchie

Tui Neri

Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Università di Pavia

Le cellule staminali posseggono la capacità di autorinnovarsi nel tempo e il potenziale di differenziarsi nei diversi tipi cellulari appartenenti ad un organismo adulto; queste caratteristiche giocano un ruolo essenziale durante lo sviluppo embrionale e la generazione dei tessuti. Esistono due tipi principali di cellule staminali: embrionali e adulte. Le cellule embrionali staminali (ESCs), derivanti dalla massa cellulare interna della blastocisti, sono in grado di dare origine a rappresentanti dei tre foglietti embrionali, ectoderma, mesoderma ed endoderma. Con il procedere dello sviluppo vengono a formarsi nell'embrione popolazioni staminali adulte deputate alla riproduzione (cellule staminali germinali, GSCs) e all'organogenesi (cellule staminali somatiche, SSCs).

Dopo la nascita queste popolazioni risiedono normalmente in speciali microambienti denominati "nicchie", la cui natura e struttura variano in funzione del tessuto di appartenenza. Definiamo nicchia di cellule staminali "una specifica area di un tessuto nel quale possono risiedere cellule staminali per un periodo di tempo indefinito durante il quale possono proliferare, automantenendosi, e generano cellule mature" (Ohlstein et al., 2004).

Il concetto di nicchia fu proposto per la prima volta da Schofield nel 1978 studiando l'emopoiesi dei mammiferi; negli anni successivi gli studi riguardanti le cellule staminali si concentrarono principalmente su *Drosophila* e *Caenorhabditis elegans* per via dell'estrema complessità strutturale anatomica dei mammiferi. Ad oggi comunque sono state individuate in questi ultimi nicchie di cellule staminali adulte appartenenti a diversi tessuti.

La nicchia fornisce un microambiente protetto che impedisce alle cellule staminali ospiti di venire in contatto con stimoli al differenziamento o all'apoptosi, mantenendo quindi intatta la riserva di SSCs dell'organismo di appartenenza; regola la proliferazione degli elementi staminali, la cui produzione eccessiva potrebbe portare alla formazione di tumori. L'importanza del mantenimento della giusta 'dose' di stimoli da parte della nicchia verso le SSCs, in tempo e qualità, è subito chiaro se, allargando il concetto di nicchia, ad esempio, ad una coltura di cellule staminali embrionali (che posseggono la loro reale nicchia nell'embrione allo stadio di blastocisti) proviamo a trapiantarle sottopelle in topi immunodepressi: il nuovo ambiente con i suoi differenti stimoli è in grado in breve tempo

di attivare una serie di programmi di differenziamento che porta alla formazione di teratomi, modificando irreversibilmente la natura indifferenziata delle ESCs (Fuchs et al., 2004).

La recente scoperta che alla base di molti tumori possano esservi cellule staminali ci riporta con forza all'importanza della presenza di un ambiente protetto all'interno della nicchia: negli adulti essa previene la tumorigenesi controllando il bilancio tra automantenimento e differenziamento delle SSCs: in questo contesto qualunque mutazione che porti una cellula staminale a uscire dal controllo della nicchia può condurre alla formazione di neoplasie. Si può quindi ipotizzare che una delle differenze tra cellule staminali normali e cancerose sia proprio la perdita da parte di queste ultime della dipendenza dai segnali della nicchia (Li et al., 2005).

La nicchia: struttura e funzione

Esiste una notevole variabilità nella struttura delle nicchie: alcuni tipi di cellule staminali adulte vivono in relativo isolamento, portandoci a ipotizzare la mancanza di questi microambienti per quel tessuto. Un esempio sono le cellule staminali del muscolo, note come cellule satelliti; normalmente allo stato quiescente sono ancorate alla lamina basale che circonda ciascun fascio di fibre muscolari e vengono riattivate a proliferare e a fondersi in miotubi differenziati quando insorge la necessità di riparare fibre danneggiate. Al contrario, tessuti sottoposti a continuo turnover posseggono tipicamente un elevato numero di nicchie dotate di una struttura più o meno complessa.

Una nicchia è costituita da una ristretta area all'interno di un tessuto, nella quale sono ospitate le cellule staminali deputate alla rigenerazione dei nuovi elementi cellulari propri di quel tessuto ed eventualmente una popolazione di cellule eterologhe di supporto (Figura 1a). Recentemente è apparso chiaro che possono esistere nicchie nelle quali non è presente questa popolazione di supporto, ma nelle quali le cellule staminali sono in diretto contatto con una matrice extracellulare e con altri costituenti non cellulari che forniscono gli stimoli necessari al loro mantenimento (Figura 1b).

La nicchia funziona come ancora fisica per le cellule staminali, oltre a fornire gli stimoli necessari al loro mantenimento. Proteine come E-caderine, integrine, β -catenine sono importanti nel mantenimento della struttura di questo microambiente, trattenendo le SSCs al sito loro riservato; le integrine ancorano le SSCs all'interno di un tessuto: una perdita o un'alterazione della loro espressione rende altamente probabile il distacco di una SSCs dalla nicchia di appartenenza attraverso differenziamento o apoptosi (Watt et al., 2000).

Le nicchie possono anche essere divise in semplici e complesse, a seconda della struttura e del numero dei diversi tipi cellulari che le compongono. Nelle nicchie semplici (Figura 2a) una SSC è associata in modo permanente con una cellula partner tramite giunzioni aderenti: la cellula staminale si divide asimmetricamente per dare origine ad un'altra cellula staminale e ad una cellula figlia maggiormente differenziata.

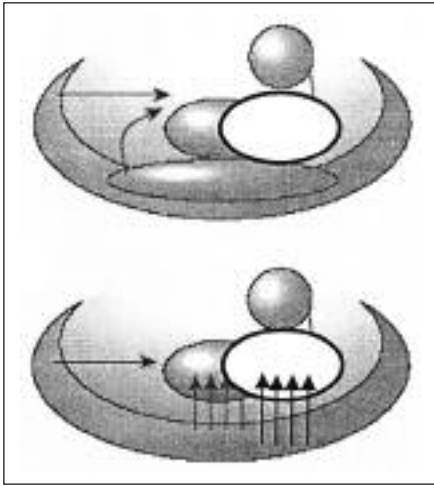


Fig. 1 - Struttura della nicchia (a: presenza di cellula di supporto; b: assenza di cellule di supporto; cellula staminale in bianco, cellula progenitrice in grigio; le frecce indicano gli stimoli provenienti dalla nicchia verso la cellula staminale). Modificato da Scadden, 2006.

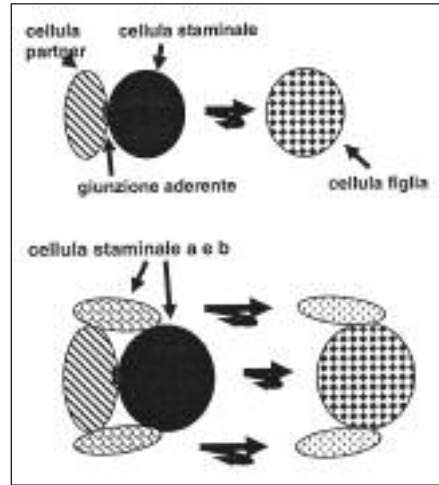


Fig. 2 - a Nicchia semplice. b Nicchia complessa. Modificato da Olhstein et al., 2004.

Nelle nicchie complesse (Figura 2b) due o più tipi di SSC sono supportate da una o più cellule partner: la loro attività è regolata in maniera coordinata da segnali provenienti dalla nicchia stessa al fine di generare prodotti cellulari diversi.

All'interno della nicchia le cellule staminali possono andare incontro a due tipi di divisione: simmetrica o asimmetrica. La divisione asimmetrica, meccanismo descritto come 'invariante', produce una cellula staminale e una cellula che inizia il processo differenziativo. Esempi di questo tipo di divisione abbondano negli organismi unicellulari e negli invertebrati (nell'ovario di *Drosophila* ad esempio). All'altro estremo troviamo meccanismi regolativi che producono, da una SSC, *in media* una cellula staminale e una cellula differenziata. La maggior parte dei tessuti di mammifero sottoposti a grande turnover appartengono a questa categoria: allo stadio stazionario (steady state) ciascuna cellula staminale dà luogo, *in media*, a una SSC e ad un progenitore, ma l'asimmetria è prodotta su una base di popolazione piuttosto che a livello di singola divisione cellulare. Nonostante i due meccanismi siano molto diversi, entrambi necessitano di sistemi di controllo a feedback e reciproche interazioni cellulari (Watt et al., 2000). La divisione asimmetrica può essere dovuta a fattori estrinseci o intrinseci: nel primo caso le cellule figlie sono inizialmente equivalenti, ma adottano differenti destini come risultato di interazioni tra loro stesse o tra loro e l'ambiente della nicchia. Nel caso di fattori intrinseci l'asimmetria è dovuta alla differente ripartizione di determinanti morfogenetici nelle due cellule figlie.

Brevemente, l'asimmetria "intrinseca" nella distribuzione dei determinanti nella cellula madre può essere dovuta ad asimmetrica localizzazione degli mRNA di interesse, alla differente localizzazione di proteine (dovuta probabilmente all'at-

tivazione di motori molecolari operanti su microfilamenti e microtubuli) o alla loro selettiva degradazione in una porzione cellulare. L'asimmetria "estrinseca" può invece essere dovuta, una volta generate le due cellule figlie, al contatto preferenziale di una delle due cellule figlie con molecole che ne inducono il differenziamento (la matrice cellulare può potenzialmente sequestrare e modulare la concentrazione locale di fattori secreti dalla nicchia).

Esistono cause (una ferita, una degenerazione tissutale) che rendono necessaria la proliferazione del compartimento staminale e l'uscita quindi dallo stato stazionario per la riparazione del danno. L'equilibrio delle divisioni cellulari nei mammiferi si sposta verso la produzione di nuovi componenti staminali (divisione simmetrica proliferativa) che a loro volta daranno origine ad una vasta popolazione di progenitori di transito (transient amplifying population, dividing transit population), i quali saranno i veri fornitori della popolazione di cellule terminalmente differenziate. Le cellule staminali della nicchia saranno andate così incontro ad un limitato numero di divisioni mitotiche, preservando da possibili mutazioni il loro patrimonio genetico. Le cellule progenitrici generate dalla divisione della cellula staminale madre migrano al di fuori della nicchia per poter portare a termine il loro programma proliferativo e differenziativo: consideriamo che queste cellule siano uscite dalla nicchia quando raggiungono un'area tissutale che non è più in grado di supportare il loro stato indifferenziato per mancanza di adeguati segnali molecolari (citochine o molecole di adesione).

Il lavoro di Potten e Loeffler del 1990 ha posto le basi per una buona comprensione dei meccanismi che regolano, nell'ambito dell'epitelio intestinale ma estendibili a gran parte dei tessuti, i rapporti tra compartimento staminale, compartimento di transito e l'ampia popolazione matura che ne deriva. Il modello a spirale da loro proposto (Figura 3)

relativo alle modalità di produzione di cellule terminalmente differenziate da parte di un compartimento somatico adulto (che altro non è se non la somma di tutte le nicchie che lo compongono) prevede che il compartimento di transito (T) possieda caratteristiche intermedie tra quello staminale (S) e quello maturo (M): le cellule "T" provenienti dalla diretta divisione delle "S" posseggono ancora una certa capacità di automantenimento (non progrediscono nella spirale ma restano per almeno un ciclo allo stesso livello), e tendono a perderla man mano che scendono nella spirale, andando ad acquisire i markers propri della popolazione matura che vanno a formare. Tra i sistemi meglio caratterizzati vi sono l'apparato digerente e il sistema nervoso, che descriverò come esempi.

Apparato digerente

Le cripte dell'intestino tenue, le nicchie dove sono contenute le SSCs che danno origine all'epitelio intestinale, sono piccole formazioni epiteliali a bottiglia che contengono circa 250 cellule appartenenti a 4 linee (enterociti, cellule goblet, cellule di Paneth e rare cellule enteroendocrine); queste popolazioni sono gerarchicamente strutturate lungo un asse cripta-villo seguendo il quale differenziano, fino a raggiungere il lume intestinale. Le cellule di Paneth, che secernono enzimi digestivi e fattori di crescita, completano il loro processo maturativo alla base

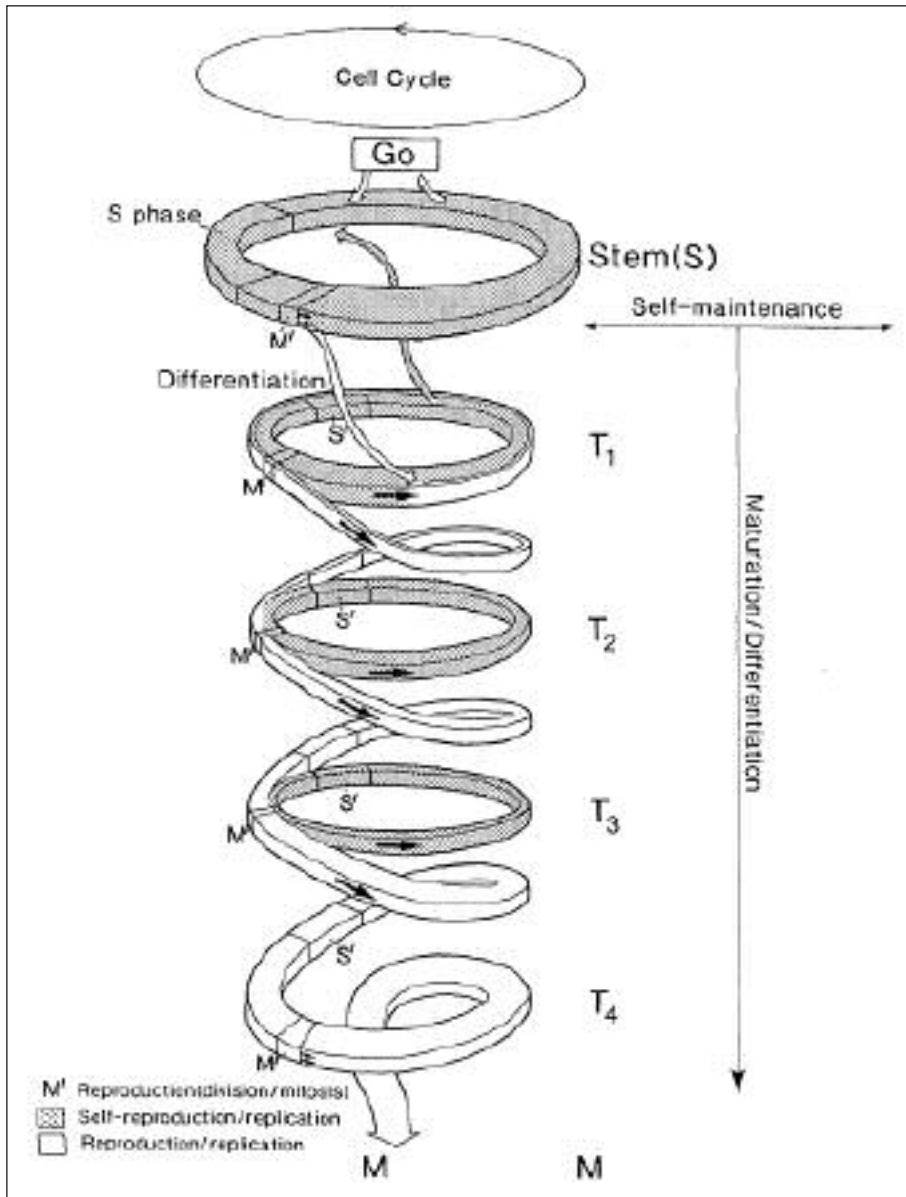


Fig. 3 - Il compartimento di transito. Modificato da Potten & Loeffler, 1990.

della cripta; le altre 3 linee epiteliali differenziano durante una rapida e ben organizzata migrazione verso la parte apicale dei villi che circondano ciascuna cripta. Si ritiene che la componente staminale sia situata approssimativamente alla quarta-quinta posizione dalla base della cripta (Figura 4) all'interno della vera e propria nicchia, circondata da uno strato fenestrato di cellule mesenchimali che ne

regolano il comportamento mediante secrezione paracrina di fattori di crescita e citochine.

Il compartimento staminale vero e proprio è composto da 4-6 cellule pluripotenti che si dividono raramente per dare origine a progenitori cellulari che rimarranno in vita per mesi, durante i quali produrranno la progenie necessaria al turnover dell'epitelio intestinale (Leedham et al., 2005). Potten ha ipotizzato l'esistenza di una struttura gerarchica all'interno della cripta, composta da tre ordini di cellule progenitrici al di sopra dell'anello dove risiedono le vere SSCs: man mano che le cellule attraversano questi strati continuano a dividersi ma perdono gradualmente clonogenicità rimanendo comunque in grado, in caso di danno

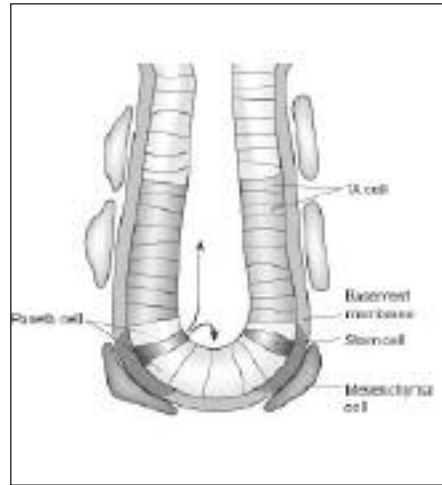


Fig. 4 - Struttura della cripta intestinale: le frecce indicano la direzione degli spostamenti delle cellule derivanti dalla divisione delle cellule staminali (TA cell: transit amplifying cell). Da Leedham et al., 2005.

alla cripta, di rigenerare la cripta stessa ed assicurarne la continuità (Marshman et al., 2002). Si pensa che la maggioranza delle divisioni delle SSCs sia di tipo asimmetrico, con ritenzione del DNA templato, il filamento stampo, all'interno della cellula staminale, permettendo così che eventuali errori di replicazione passino nelle cellule figlie e che vengano persi una volta che queste hanno raggiunto il lume intestinale, terminando il loro ciclo (Potten et al., 2002). Oltre ad una produzione 'verticale' di cellule nelle cripte avviene un fenomeno chiamato fissione: queste ultime vanno incontro ad una biforcazione basale seguita da una divisione longitudinale, con formazione di due cripte figlie; questo processo è ritenuto essere centrale durante il massiccio incremento nel numero di cripte (sia nell'intestino tenue che in quello crasso) durante il periodo post-natale (Maskens et al., 1981). Originariamente si pensava che ci fosse una 'misura soglia' superata la quale la cripta entrasse automaticamente in fissione; si ritiene ora che il fattore principale sia il numero di cellule staminali: un raddoppiamento nel loro numero provocherebbe la fissione della cripta (Loeffler et al., 1993).

Sistema nervoso

Durante lo sviluppo del cervello le cellule staminali neuroepiteliali, situate nella zona adiacente ai ventricoli, danno origine a neuroni e glia (Temple, 2001). Le cellule della glia, a lungo considerate solo cellule di supporto, comprendono astrociti e oligodendrociti; nonostante la neurogenesi sia completata quasi completamente alla nascita, la gliogenesi continua durante tutta la vita dell'organismo. Due regioni germinali che sono in grado di generare numerosi neuroni persistono nel mammifero adulto: la zona subventricolare (subventricular zone, SVZ) dei ventricoli laterali e la regione subgranulare (subgranular zone, SGZ)

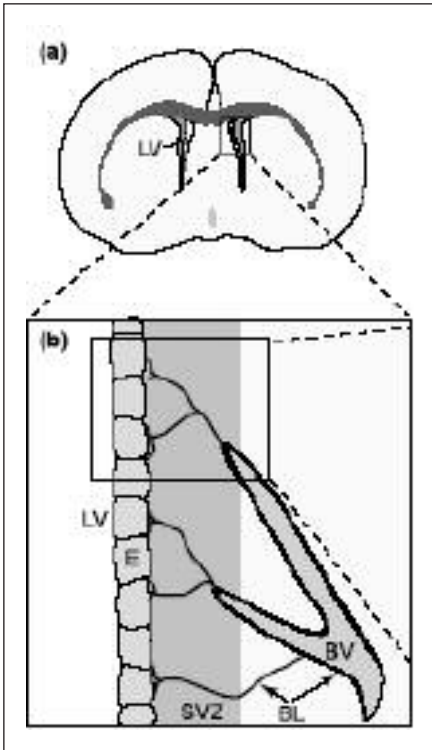


Fig. 5 - Struttura del ventricolo laterale; a: sezione trasversale di encefalo di topo a livello dei ventricoli laterali; b: ingrandimento della regione subventricolare (LV: ventricolo laterale; BV: vaso sanguigno; BL: lamina basale; E: cellule endodiali). Da Doetsch, 2003.

dell'ippocampo; le cellule staminali nervose che si scoprì risiedere in queste aree, sorprendentemente non sono cellule amorphe e indifferenziate, ma mostrano a livello ultrastrutturale e molecolare caratteristiche appartenenti ad astrociti maturi, inclusa l'espressione di filamenti intermedi gliali (glial fibrillary acidic protein, GFAP).

L'SVZ, alla quale limiterò la descrizione, è composta da uno strato di cellule in attiva divisione lungo la parete laterale del ventricolo laterale (Figura 5).

Nuovi neuroni nascono nell'SVZ, nicchia nel sistema nervoso, e raggiungono catene di neuroni migranti che si uniscono a formare la catena migratoria rostrale (RMS, Rostral Migratory Stream) la quale ha come punto di arrivo il bulbo olfattorio, dove queste cellule differenziano in neuroni granulari e periglomerulari. Nell'SVZ esistono 4 tipi principali di cellule: neuroblasti (cellule A), astrociti dell'SVZ (cellule B), precursori immaturi (cellule C) e cellule endodiali; un singolo strato di cellule endodiali multiciliate separa l'SVZ dal ventricolo laterale. I neuro-

blasti si dividono durante la migrazione attraverso tunnel gliali formati dai processi degli astrociti in lenta divisione; foci locali di precursori in rapida divisione (cellule C) sono dispersi lungo il sistema di catene dell'RMS. La lamina basale, che si estende dai vasi sanguigni nell'SVZ e termina in piccoli 'bulbi' adiacenti alle cellule endodiali, contatta tutti i tipi di cellule presenti nell'SVZ. Gli astrociti dell'SVZ sono le cellule staminali del sistema nervoso, e si dividono a generare i neuroblasti attraverso la formazione di una popolazione di transito (cellule C) (Doetsch et al., 1999).

Queste cellule, in stretto contatto reciproco mediante giunzioni gap, agiscono come sensori e regolatori della nicchia: i loro processi cellulari contattano tutti i tipi di cellule oltre alla membrana basale dei vasi sanguigni. In questo modo sono in grado di apprezzare alterazioni nel numero dei neuroni e dei loro precursori, oltre che recepire segnali dal sistema vascolare e da altre regioni germinali. Non è tuttora chiaro il modo in cui gli astrociti riescano a integrare i ruoli di cellule di supporto e cellule staminali, e se tutti gli astrociti del sistema nervoso siano cellule staminali in potenza (Doetsch, 2003).

Bibliografia

1. Doetsch et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain, *Cell*, 97:703-716, 1999.
2. Doetsch. A niche for adult stem cells, *Current Opinion in Genetics & Development*, 13:543-550, 2003.
3. Fuchs et al. Socializing with the Neighbors: Stem Cells and Their Niche, *Cell*, Vol. 116, 769-778, 2004.
4. Leedham et al. Intestinal stem cells, *J. Cell. Mol. Med.* Vol 9, No 1: 11-24, 2005.
5. Li et al. Stem Cell Niche: Structure and Function, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 21: 605-31, 2005.
6. Loeffler et al. Somatic mutation, monoclonality and stochastic models of stem cell organization in the intestinal crypt, *J. Theor. Biol.*, 160: 471-491, 1993.
7. Marshman et al. The intestinal epithelial stem cell, *Bioessays*, 24: 91-98, 2002.
8. Maskens et al. Kinetics of tissue proliferation in colorectal mucosa during post-natal growth, *Cell Tissue Kinet*, 14: 467-477, 1981.
9. Ohlstein et al. The stem cell niche: theme and variations, *Current Opinion in Cell Biology*, 16: 693-699, 2004.
10. Potten et al. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls, and uncertainties. Lessons for and from the Crypt, *Development* 110, 1001-1020, 1990.
11. Potten et al. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands, *J. Cell. Sci.*, 115: 2381-2388, 2002.
12. Scadden. The stem-cell niche as an entity of action, *Nature*, Vol. 441: 1075-1079, 2006.
13. Schofield. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell, *Blood Cells*, 4, 7-25, 1978.
14. Watt et al. Out of Eden: Stem Cells and Their Niches, *Science*, Vol 287: 1427-1430, 2000.
15. Temple, "The development of neural stem cells", *Nature* 414: 112-117, 2001.

Microambiente osteo-midollare

Gian Luigi Castoldi

Sezione di Ematologia, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Ferrara

Negli ultimi anni si è venuto consolidando il concetto che nel midollo osseo, accanto alle cellule del sistema ematopoietico, occupino una posizione di rilievo anche le cellule del sistema mesenchimale e degli elementi maturi derivati da queste (fibroblasti osteoblasti, cellule cartilaginee, adipociti) atti a formare il microambiente stromale nel quale le cellule emopoietiche sono collocate (Figura 1).

Come è noto il microambiente stromale (Figura 2) è costituito da una eterogenea composizione di cellule ove elementi di tipo non emopoietico non soltanto forniscono un supporto strutturale alle cellule emopoietiche, ma provvedono anche, dal punto di vista funzionale, alla elaborazione di fattori di crescita e a favorire una serie di interazioni fra cellula e cellula e fra cellule e matrice extracellulare (Jiang et al., 2002; Lakshmipathy e Verfaillie, 2005). In termini funzionali fanno parte del microambiente stromale non solo le cellule di origine mesenchimale, ma

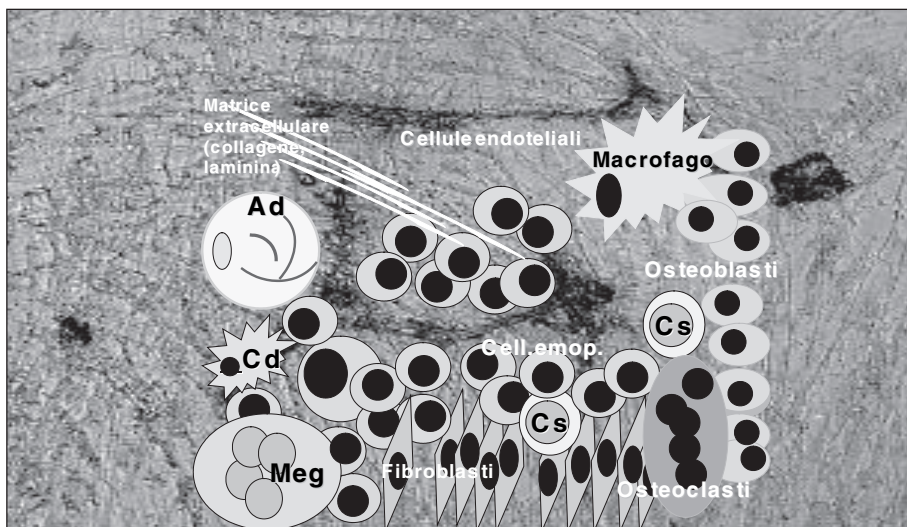


Fig. 1 - Rappresentazione schematica del tessuto midollare ove confluiscono elementi di derivazione delle cellule emopoietiche ed elementi di derivazione mesenchimale.

Legende: Ad: adipocito; Cs: Cellula staminale emopoietica; Cd: cellula dendritica; Meg: megacariocito.

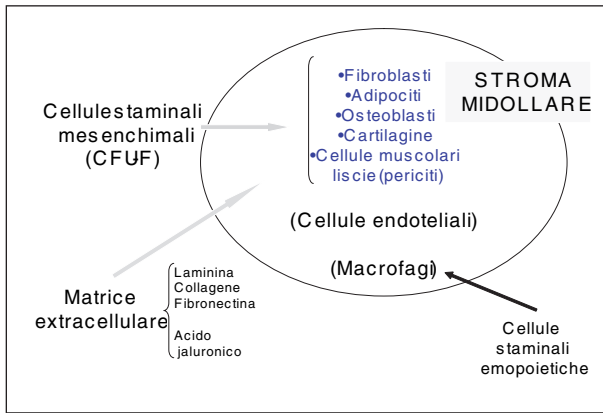


Fig. 2 - Stroma midollare costituito da elementi mesenchimali maturi (fibroblasti, osteoblasti, adipociti, condroblasti, miociti) e da componenti della matrice extracellulare (laminina, collagene, fibronectina, acido ialuronico). Per convenzione fanno parte dello stroma anche gli endoteli e le cellule macrofagiche (peraltro di derivazione monocitaria dal sistema emopoietico).

anche le cellule reticolari (macrofagi) di derivazione dagli elementi del sistema emopoietico e gli endoteli dei sinusoidi capillari, la cui origine, tuttora controversa, coinvolgerebbe le cellule emopoietiche midollari, o in alternativa, le cellule mesenchimali (Castoldi et al., 2006, Rigolin et al., 2006).

Un ruolo chiave nella funzione del microambiente osteo-midollare sembra essere espletato dagli osteoblasti, che, insieme alle proteine della matrice extracellulare ed ai sali minerali (Ca^{++}), concorrono a formare una entità particolare designata come “*nicchia*”.

Il concetto di nicchia, elaborato da Schofield nel 1978 (e preconizzato da Trentin), può essere visualizzato, nei tessuti adulti, come uno spazio ben distinto nel quale risiedono le cellule staminali emopoietiche che possono andare incontro ad automantenimento e, per differenziazione, produrre una serie numerosa di discendenti (Moore 2004; Moore e Lemischka, 2006; Yin e Li, 2006).

Nel caso specifico delle cellule staminali emopoietiche queste sembrano avere uno stretto rapporto con gli osteoblasti disposti a livello della superficie endosteale (interna) dell'osso (come dimostrato nei processi di “*homing*”). Questa particolare disposizione anatomica suggerisce una stretta interazione fra i due tipi cel-

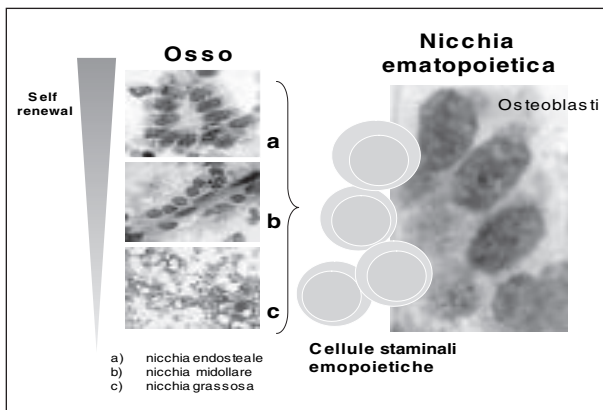


Fig. 3 - Nicchia emopoietica e suoi principali compartimenti (nicchia ossea, nicchia stromale (midollare), nicchia grassosa).

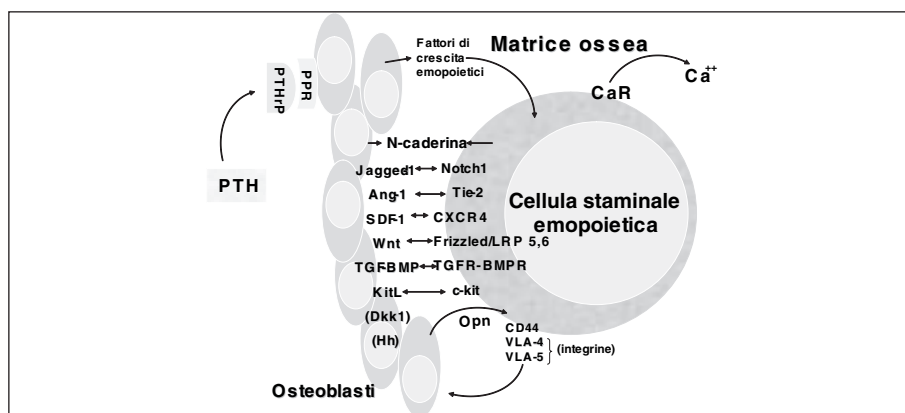


Fig. 4 - Schema illustrante i rapporti fra le cellule staminali emopoietiche e gli osteoblasti della nicchia endosteale. Accanto a molecole di adesione (quali ad es. N-caderina, CD44, VLA 4,5 – Very late antigen) sono mostrati, in grassetto, i ligandi espressi dagli osteoblasti (Ang-1, Wnt, Jagged-1, SDF-1, BMP) e rispettivi recettori (Tie-2, Frizzled / LRP-5,6, Notch-1, CXCR4, BMPr) espressi dalle cellule staminali ai fini della loro interazione.

Legende: Ang-1: Angiopoietina-1; Wnt: Wingless; Hh: Hedgehog; TGF-BMP: Transforming growth factor- β family e Bone morphogenic protein family - (R: receptor); LRP5,6: Lipoprotein-related receptor proteins 5 e 6; KL: Kit ligand; Dkk: Dickkopf; VLA: Very late antigen (integrine); CaR: Ca²⁺ sensing receptor; Opn : Osteopontina.

Sono mostrati altresì I rapporti fra PTH (Parathyroid hormone) e suoi derivati (PTH-related protein : PTHrP) che stimolano gli osteoblasti attraverso PPR (PTHrP-receptor).

lulari finalizzati, da un lato, all'accrescimento e rimodellamento osseo e alla formazione dei componenti ematici dall'altro. La nicchia emopoietica potrebbe essere ulteriormente suddivisa in tre compartimenti funzionali (Dazzi et al., 2006) costituiti da:

- una *nicchia ossea* propriamente delimitata dagli osteoblasti in prossimità della superficie endosteale;
- una *nicchia stromale* o midollare contenente cellule reticolari, fibroblasti, adipociti, cellule endoteliali e macrofagi (situata nella parte midollare dell'osso) ed infine;
- una *nicchia grassosa*, prevalentemente costituita da adipociti collocata a livello degli spazi non ematopoietici delle ossa lunghe ("midollo giallo") (Figura 3). In alternativa alla "*nicchia emopoietica*" è stata ipotizzata a livello dell'osso anche una "*nicchia vascolare*" in funzione della sua caratteristica di contenitore di cellule staminali emopoietiche (Yin e Li, 2006). Mentre la nicchia osteoblastica sarebbe deputata principalmente al mantenimento delle cellule staminali, la nicchia vascolare faciliterebbe la migrazione transendoteliale delle cellule staminali stesse nelle fasi di insediamento a livello midollare favorendone la proliferazione e l'ulteriore differenziazione.

Numerose molecole di adesione e citochine regolatorie entrano in gioco nelle nei passaggi fra questi due tipi di nicchie quali SCF/c-kit, Jagged/Notch, angiopoietin-1/Tie2 e Ca²⁺ sensing receptor (CaR) (Adams e Scadden, 2006) (Figura 4).

Un ruolo particolare nel mantenimento della attività della nicchia endosteale è

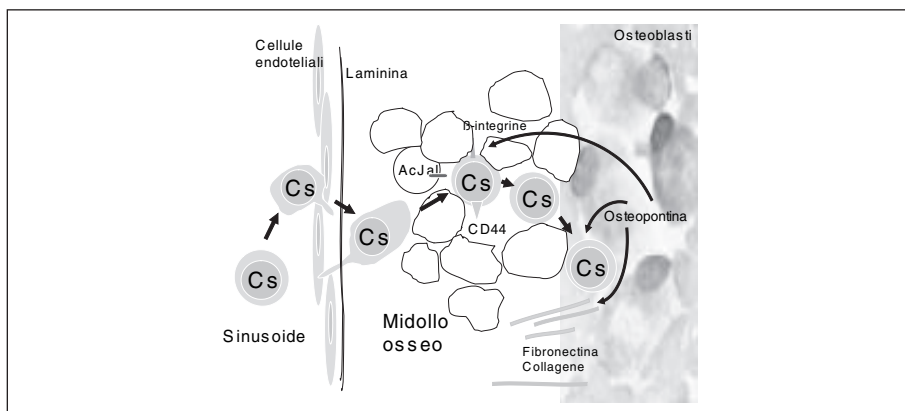


Fig. 5 - Schema della interazione fra osteopontina ed il microambiente emopoietico. L'osteopontina è coinvolta nel regolare la migrazione transendoteliale delle cellule staminali emopoietiche nella fasi di trapianto, il loro ancoraggio nella nicchia endosteale, e nel formare complessi con il collagene e la fibronectina nella matrice extracellulare.

Legende: Cs: cellule staminali; Ac.Jal.: acido ialuronico.; CD44: Molecola associata al citoscheletro di molti tipi cellulari in grado di legarsi a componenti della matrice cellulare (jaluronato, collagene, fibronectina), (modificato da Haylock e Nilsson, 2006).

rappresentato dalla osteopontina (Adams e Scadden 2006). Questa glicoproteina fosforilata, sintetizzata dagli osteoblasti è in grado di legarsi a recettori di superficie delle cellule staminali emopoietiche (CD44, $\alpha 4$ - e $\alpha 5, 1$ - integrine) e di agire come un potente fattore di contenimento della crescita delle cellule staminali delle quali, peraltro, favorisce l'automantenimento. A livello della nicchia endosteale, l'osteopontina (come risulta nei processi di trapianto) è coinvolta nella tras migrazione delle cellule staminali emopoietiche, nell'ancoraggio delle stesse alla nicchia e nei legami con i componenti (collagene, fibronectina) della matrice extracellulare (Adams e Scadden, 2006, Haylock e Nilsson, 2006) (Figura 5).

Come tutte le cellule emopoietiche, anche le cellule staminali mesenchimali e gli elementi maturi differenziati da esse derivati possono essere danneggiati da trattamenti chemioterapici dimostrando una sensibilità differenziale ai diversi tipi di terapia (Li et al. 2006), in particolare più spiccata per farmaci quali vincristina, paclitaxel, ARA-C, etoposide.

Queste considerazioni, soprattutto per quanto riguarda la conservazione del microambiente osteomidollare, devono essere tenute in considerazione per le possibili applicazioni future delle cellule mesenchimali in terapia.

Bibliografia

1. Adams GB. Stem cell engraftment and the endosteal niche is specified by the calcium sensing receptor. *Nature*, 439: 599-603, 2006.
2. Adams GB., Scadden DT. The haemopoietic stem cell in its place. *Nature Immunol.*, 7: 333-337, 2006.

3. Arai F., Hirao A., Suda T. Regulation of hematopoietic stem cells by the niche. *TCM*, 15: 75-79, 2005.
4. Bianco P., Robey PG. Marrow stromal stem cells. *J. Clin. Invest.* 105: 1663-1668, 2000.
5. Castoldi GL., Cuneo A., Rigolin GM. Recruitment of stem cells into angiogenesis. In: Staton C., Lewis C., Bicknell R. (eds.): *Angiogenesis assays: A critical appraisal of current techniques*. J. Wiley, London, 2006 (in press).
6. Castoldi GL, Dominici M., Campioni D., Lanza F. Cellule staminali mesenchimali: Potenzialità evolutiva ed applicazioni cliniche: *Progr. Ematol. Clin.* 20: 63-69, 2001.
7. Corre J., Planat-Bernard V., Corberand JX., Pènicaud L., Casteilla L., Laharrague P. Human bone marrow adipocytes support complete myeloid and lymphoid differentiation from human CD34+ cells. *Br. J. Haematol.* 127: 344-347, 2004.
8. Dazzi F., Ramasamy R., Glennie S., Jones SP., Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev.* 20: 161-171, 2006.
9. Haylock DN., Nilsson SK. Osteopontin: a bridge between bone and blood. *Br. J. Haematol.* 134: 467-474, 2006.
10. Kirstetter P., Anderson K., Porse BT., Jacobsen SEW., Nerlov C. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nature Immunol.* 7: 1048-1056, 2006.
11. Jiang Y., Jahagirdar BN., Reinhardt RL., Schwartz RE., Keene CD., Ortiz-Gonzalez XR., Reyes M., Lenvik T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low WC. Largaespada DA., Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418: 41-49, 2002.
12. Lakshminpathy U., Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood Rev.* 19: 29-38, 2005.
13. Li J., Law HKW., Lau YL., Chan GCF. Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. *Br. J. Haematol.* 127: 326-334, 2004.
14. Moore KA. Recent advances in defining the haemopoietic stem cell niche. *Curr. Opin. Hematol.* 11: 107-111, 2004.
15. Moore KA., Lemischka R. Stem cells and their niches. *Science*, 311: 1880-1885, 2006.
16. Rigolin GM., Fraulini C., Ciccone M., Mauro E., Bugli AM., De Angeli C., Negrini M., Cuneo A., Castoldi GL. Neoplastic circulating endothelial cells in multiple myeloma with 13q14 deletion. *Blood*, 107: 2531-2535, 2006.
17. Scadden DT. The stem-cell niche a an entity of action. *Nature*, 441: 1075-1079, 2006.
18. Yin T., Li L. The stem cell niche in bone. *J. Clin. Invest.* 116: 1195-1201, 2006.

Homing delle cellule staminali

Carlo Bernasconi

Già Professore Ordinario di Ematologia, Università di Pavia.

Consulente ematologo e coordinatore della ricerca sulle cellule staminali, IRCCS Fondazione "Salvatore Maugeri", Pavia

Risale alla fine degli anni '50 la prima dimostrazione sperimentale che il trapianto di midollo osseo, praticato con l'infusione endovenosa di cellule osteomidollari, protegge i cani dagli effetti letali dell'irradiazione ad alte dosi (Alpen e Baum, 1958; Mannick et al., 1960). La conferma che cellule staminali midollari somministrate endovena sono capaci di accasarsi ed attecchire nel midollo osseo, dando origine ad una duratura ricostituzione ematologica e immunologica, è stata ottenuta nell'uomo circa 15 anni dopo, con il risultato favorevole di trapianti di cellule osteomidollari allogeniche immunologicamente compatibili da fratelli sani in pazienti con anemia aplastica o con leucemia mieloide cronica (Thomas et al., 1975).

Sebbene fosse quindi noto dagli anni '70 che cellule staminali ematopoietiche (CSE) iniettate in vena sono capaci di ripopolare il midollo osseo distrutto dalla radioterapia e/o dalla chemioterapia ad alte dosi, sono stati necessari altri due decenni per incominciare a capire i meccanismi molecolari e cellulari dell'accasamento delle cellule staminali nel midollo osseo (Tavassoli e Hardy, 1990). Successivamente sono stati indagati i complessi processi coinvolti nell'adesione e passaggio delle cellule staminali attraverso l'endotelio dei vasi midollari, il loro alloggiamento in nicchie nel midollo osseo e la loro proliferazione nel microambiente midollare. In particolare, recentemente è stata richiamata l'attenzione sull'importante ruolo svolto in questi processi dalle nicchie endosteali (Calvi et al., 2003) e dalle nicchie vascolari (Kopp et al., 2005) del midollo osseo.

Inoltre, sono state attivamente studiate alcune interazioni fondamentali che regolano il traffico (ritenzione nel midollo osseo o mobilizzazione nel sangue periferico) delle CSE, come ad esempio l'asse SDF-1/CXCR4, costituito dalla chemochina SDF-1 (*stromal derived factor-1*) prodotta dalle cellule stromali midollari e dal suo recettore CXCR4 espresso sulle cellule staminali e progenitrici umane (Kucia et al., 2005). Meccanismi analoghi sono coinvolti anche nel traffico (metastatzizzazione) di cellule staminali tumorali (Liang et al., 2004; Kucia et al., 2005). Dall'insieme delle nuove conoscenze sui processi che regolano l'accasamento (*homing*) e la mobilizzazione, l'attecchimento (*engraftment*) e la successiva moltiplicazione delle cellule staminali sono già derivate utili applicazioni terapeuti-

che. Certamente il potenziale sviluppo clinico di queste acquisizioni biologiche in medicina rigenerativa e in oncologia è del tutto iniziale.

Terminologia

Nella comunità scientifica i termini *homing* e *engraftment* sono di uso corrente; verranno quindi utilizzati nel proseguire la presente trattazione. Per chiarezza di esposizione appare opportuno sottolineare che i due termini definiscono processi differenti, anche se in parte sovrapposti: l'*homing* delle cellule staminali nel midollo osseo è necessario per garantire il loro *engraftment* e il ripopolamento midollare, ma non sufficiente (Lapidop et al., 2005). È quindi necessario precisare bene il significato dei due termini.

Homing è il primo processo, e si svolge abbastanza rapidamente (in alcune ore e al massimo in 1-2 giorni). Consiste nell'attivo passaggio attraverso la barriera endoteliale sangue/midollo delle cellule ematopoietiche dal torrente circolatorio agli spazi extravascolari osteomidollari, e nel loro alloggiamento almeno transitorio nel compartimento midollare mediante attivazione di meccanismi di adesione e interazione, prima di una loro proliferazione. L'*homing* di cellule staminali può essere diretto anche verso altri organi, soprattutto in risposta a segnali di stress trasmessi in situazioni di danno tissutale.

Successivamente all'*homing* si svolgono l'*engraftment* e la ripopolazione midollare. L'*engraftment* a breve termine (da alcune settimane a pochi mesi) viene iniziato dai progenitori differenziati, mentre l'*engraftment* duraturo (per anni) viene svolto dalle cellule staminali che si sono alloggiate nelle loro nicchie specializzate. Le CSE richiedono quindi il microambiente osteomidollare, che regola la loro migrazione, proliferazione e differenziazione per mantenere attiva l'ematopoiesi per tutta la vita.

Adesione e passaggio attraverso gli endoteli sinusoidali

La prima fase per un appropriato *homing* nel midollo osseo delle CSE somministrate endovena è l'interazione delle cellule staminali trapiantate con le cellule degli endoteli dei sinusoidi midollari, e il loro passaggio attraverso l'endotelio stesso (Lapidop et al., 2005). Questo processo è governato da molteplici interazioni fra molecole di adesione cellulare e i corrispondenti ligandi.

Le cellule staminali e i progenitori ematopoietici esprimono parecchie molecole di adesione, che comprendono integrine (molecole eterodimeriche transmembrana, consistenti di subunità α e β , che mediano l'adesione e la migrazione cellulare), sialomucine e isoforme CD44. Le cellule endoteliali nei sinusoidi osteomidollari esprimono E- e P-selectine (lectine legate alla membrana), che legano alla superficie cellulare i ligandi espressi sulle CSE. Il PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand 1*) è un esempio di tali ligandi per le P-selectine. Parecchi studi hanno confermato che l'interazione cooperativa di E- e P-selectine con i corrispondenti ligandi glicosilati media l'iniziale adesione e passaggio delle cellule attraverso la parete endoteliale, come pure il reclutamento leucocitario nelle sedi di infiammazione.

Una volta che le cellule sono trattenute alla parete endoteliale, chemochine attraenti quali l'SDF-1 (*stromal derived factor-1*) inducono una cascata di segnali intracellulari che portano ad una attivazione delle integrine stesse. In particolare il derivato $\alpha 4\beta 1$ integrina, indicato anche come VLA-4 (*very-late antigen-4*) si lega al corrispondente recettore sulle cellule endoteliali, il VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecole-1*), producendo una salda adesione cellulare.

Inoltre, è stato segnalato che anche l'espressione di CD44 sulle cellule staminali e progenitori ematopoietici, che lega l'acido ialuronico presente sulla superficie delle cellule endoteliali midollari, svolge un importante ruolo nell'*homing* delle CSE nel midollo osseo (Avigdor et al., 2004). La precisa natura della convergenza dei differenti percorsi dell'adesione cellulare nell'*homing* delle cellule staminali deve ancora essere definita, tuttavia è da sottolineare che l'SDF-1, oltre che intervenire nella interazione VLA-4/VCAM-1, potenzia il legame CD44/acido ialuronico. In conclusione, gli studi sino ad ora condotti dimostrano quindi un ruolo cooperativo e modulatorio dell'SDF-1 nel potenziare l'adesione delle CSE agli endoteli sinusoidali midollari, attraverso i suoi effetti sulle integrine e sull'attività CD44.

Mentre numerosi studi sperimentali hanno ben dimostrato l'importanza delle integrine, sialomucine e selectine nell'adesione e fissazione delle CSE agli endoteli, rimangono ancora meno ben definiti i meccanismi che regolano il passaggio delle cellule staminali attraverso la parete vasale, sino a raggiungere le nicchie extravascolari nel midollo osseo. Tuttavia, i dati al riguardo esistenti suggeriscono ancora una volta il ruolo preminente svolto dall'SDF-1 nell'orchestrare questo processo. In un modello sperimentale nel topo immunodepresso è stato dimostrato che l'SDF-1 induce una migrazione transendoteliale (Peled et al., 2000) e aumenta l'interazione di CD44 espresso sulle CSE con l'acido ialuronico presente all'interno delle nicchie endosteali (Avigdor et al., 2004). Quindi i gradienti di SDF-1 contribuiscono significativamente ai processi di migrazione transendoteliale attraverso le pareti dei vasi midollari, sino a raggiungere gli spazi extravascolari e le nicchie endosteali.

Asse SDF-1 / CXCR4

SDF-1 è un membro della famiglia delle chemochine ed è espresso sia sulle cellule stromali midollari sia sulle cellule endoteliali. È stato dimostrato *in vitro* che la migrazione di cellule umane CD34+ attraverso un gradiente SDF-1 mostra di correlare con il potenziale di queste cellule di ripopolazione ematopoietica *in vivo*, sia in topi immunodepressi sia in pazienti. Inoltre, il condizionamento di un ricevente al trapianto, sia con chemioterapia sia con panirradiazione, causa un incremento della secrezione di SDF-1 *in vivo*. L'interazione di SDF-1 con il suo recettore CXCR4, espresso sulle cellule staminali e progenitori umani, è l'asse primario che governa l'*homing* e l'*engraftment* nel midollo osseo dopo il trapianto (Lapidot et al., 2005). Per contro, è stato dimostrato che il successo dell'*homing* e *engraftment* di CSE umane nel topo immunodepresso è significativamente ridotto se l'asse SDF-1/CXCR4 è impedito.

Accanto ai numerosi dati sperimentali e clinici che dimostrano il ruolo primario svolto dall'asse SDF-1/CXCR4 nell' *homing* e attecchimento delle cellule staminali, altri studi suggeriscono più complesse interferenze tra asse SDF-1/CXCR4 e interazioni fra altre molecole di adesione cellulare e corrispondenti ligandi (Bonig et al., 2006). Per esempio, è stato dimostrato che il CD26 (un enzima peptidasi) è un potente regolatore negativo dell'*homing* delle CSE; infatti la sua inibizione è associata con un aumento della capacità delle cellule staminali di ripopolare il midollo osseo *in vivo*. Inoltre, poiché il legame del recettore CXCR4 con SDF-1 segnala attraverso la proteina-Gi, è stato riportato che l'incubazione di cellule umane CD34+ con un Gi-inibitore (PTX) riduce l'*homing* delle cellule staminali. Recenti studi sperimentali nel topo hanno poi dimostrato che cellule midollari rese non-responsive all'SDF-1 mediante pre-incubazione con un antagonista di CXCR4 (AMD3100), o rese refrattarie ai segnali-Gi mediante incubazione con un inibitore della proteina-Gi (PTX), ripopolano molto efficacemente il midollo osseo dei topi trapiantati (Bonig et al., 2006).

In questi studi è stato osservato che interazioni compensatorie tra α 4-integrine e VCAM-1 facilitano l'*homing* delle cellule staminali in assenza dell'interazione SDF-1/CXCR4 (Bonig et al., 2006). Questi Autori hanno inoltre dimostrato che il blocco combinato delle interazioni α 4-integrine/VCAM-1 e SDF-1/CXCR4 riduce drammaticamente l'*homing* nel midollo osseo. Come suggerito dagli Autori citati, i dati sperimentali complessivamente raccolti indicano un'orchestrazione di interazioni fra integrine, molecole di adesione cellulare e SDF-1, che assicura un appropriato *homing* delle cellule staminali trapiantate nelle nicchie del midollo osseo (Chute, 2006).

Le nicchie del midollo osseo

Le cellule staminali e i progenitori ematopoietici che hanno attraversato la parete degli endoteli sinusoidali, e sono entrate nel tessuto extravascolare del midollo osseo, vanno ad alloggiare in nicchie endosteali e vascolari.

Nicchie endosteali. È noto da parecchio tempo che i progenitori ematopoietici primitivi sperimentalmente riconoscibili (ad esempio le CFU-S, *colony forming unit-spleen*) risiedono prevalentemente nella regione endosteale, in stretta connessione con l'endostio (Gong, 1978), mentre i progenitori ematopoietici commissionati risiedono più liberamente nella regione midollare centrale. Gli osteoblasti che sono allineati sulla superficie dell'endostio secernono fattori di crescita ematopoietici, come il G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*), ma il loro contributo a sostegno dei meccanismi dell'ematopoiesi è rimasto poco chiaro sino in epoca recente. È stato ora dimostrato che gli osteoblasti sostengono e mantengono l'ematopoiesi *in vitro* e *in vivo* mediante la produzione della proteina Jagged 1 e l'attivazione di Notch nelle CSE (Calvi et al., 2003). È stato inoltre riportato che le CSE sono mantenute *in vivo* nel midollo osseo da interazioni di contatto cellulare con gli osteoblasti (Zhang et al., 2003). Più recentemente è stato dimostrato che la migrazione delle CSE e il loro *engraftment* nelle nicchie endosteali sono guidati e condizionati da un recettore sensibile al calcio (CaR),

che è altamente espresso sulle CSE e risponde all'alta concentrazione di ioni calcio presente nelle nicchie endosteali (Adams et al., 2006).

Questi studi considerati complessivamente confermano l'importanza funzionale degli osteoblasti nel mantenimento dell'ematopoiesi *in vivo*, e dimostrano il ruolo critico svolto dalle nicchie endosteali nella regolazione e nel mantenimento delle CSE.

Nicchie vascolari. Che nicchie vascolari nel tessuto osteomidollare possano svolgere un ruolo di sostegno dell'ematopoiesi è stato ipotizzato sulla base di studi che hanno dimostrato come le cellule endoteliali vascolari promuovano la proliferazione, differenziazione e mobilizzazione delle cellule staminali e progenitori ematopoietici (Kopp et al., 2005). Ad esempio, in risposta ad un aumento dei livelli di chemochine FGF-4 (*fibroblast growth factor-4*) e SDF-1, i precursori megacariocitari nel midollo osseo migrano e si associano strettamente con le cellule degli endoteli sinusoidali midollari; successivamente i megacariociti attraversano le cellule endoteliali e rilasciano le piastrine nel torrente circolatorio (Avecilla et al., 2004). Poiché la somministrazione di SDF-1 o FGF-4 da sola non produce un incremento piastrinico, è prospettabile che l'interazione fra megacariociti e cellule endoteliali midollari sia critica nel causare un aumento della produzione di piastrine.

Altri studi hanno dimostrato che l'attivazione angiopoietina/Tie-2 contribuisce al ripristino della vascolarizzazione nel midollo osseo dopo un grave danno indotto con 5FU, mentre l'inibizione del segnale Tie-2 impedisce sia la neovascolarizzazione che il recupero ematopoietico midollare (Kopp et al., 2005). Il contributo delle cellule endoteliali vascolari a sostegno dell'ematopoiesi è anche suggerito dai risultati di studi sperimentali, che hanno dimostrato *in vitro* un supporto delle cellule endoteliali alla megacariocitopoiesi e alla mielopoiesi. Inoltre, studi anatomici recenti hanno dimostrato che CSE risiedono in stretta prossimità delle cellule endoteliali sinusoidali midollari, oltre che vicino all'endostio (Kiel et al., 2005). In conclusione, i dati esistenti indicano che le CSE trapiantate dapprima vanno ad occupare le nicchie endosteali. In condizioni fisiologiche o in situazioni di stress si verifica una successione di eventi che può facilitare la migrazione, proliferazione e mobilizzazione delle cellule staminali e dei progenitori dalle nicchie endosteali alle nicchie vascolari midollari, e infine il passaggio in circolo degli elementi maturi. Per esempio, una chemioterapia mieloablativa induce la produzione di SDF-1 che, a sua volta, stimola un aumento dell'attività metallo-proteinasi-9, causante un incremento nel midollo osseo dei livelli di SCF solubile (Heissig et al., 2002). La produzione di SCF induce le CSE a migrare dalle nicchie endosteali nelle nicchie vascolari midollari, e successivamente a proliferare, differenziare e passare nel torrente circolatorio.

Traffico delle cellule staminali normali e metastasi delle cellule staminali tumorali

È stato più sopra riportato che l'asse costituito dalla chemochina stromale SDF-1 e dal corrispondente recettore transmembrana CXCR4 svolge un ruolo fondamentale nel regolare il traffico delle cellule staminali e progenitori ematopoietici

fra compartimento midollare e circolazione periferica. È ora da sottolineare che il recettore CXCR4, funzionalmente attivo, è anche espresso da cellule staminali tessuto-commissionate (TCSC, *tissue-committed stem cell*) non-ematopoietiche (Kucia et al., 2005). Quindi l'asse SDF-1/CXCR4 si presenta come il regolatore centrale del traffico dei vari tipi di cellule staminali nell'organismo.

Poiché i tumori in maggior parte, se non tutti, originano nel compartimento delle cellule staminali/progenitori tessutali, anche le cellule neoplastiche esprimono sulla loro superficie il CXCR4, e l'asse SDF-1/CXCR4 appare direttamente coinvolto nel loro traffico/ metastatizzazione in organi che esprimono ad alto titolo l'SDF-1 (ad esempio, linfonodi, polmone, fegato, osso). È stata quindi formulata l'ipotesi che meccanismi molecolari molto simili regolino il traffico delle cellule staminali normali e le metastasi delle cellule staminali tumorali (Kucia et al., 2005).

La responsività delle cellule staminali normali o tumorali CXCR4+ al gradiente SDF-1 può essere regolata positivamente con diverse piccole molecole correlate a processi infiammatori che aumentano l'incorporazione di CXCR4 nel veicolo lipidico della membrana cellulare, oppure può essere inibita con piccoli peptici antagonisti di CXCR4. Ne deriva che strategie tendenti a modulare la funzione dell'asse SDF-1/CXCR4 potrebbero avere importanti applicazioni cliniche sia in medicina rigenerativa per fornire cellule staminali normali a organi o tessuti, sia in ematologia/oncologia clinica per ostacolare le metastasi di cellule staminali tumorali.

Bibliografia

1. Alpen E., Baum S. Modification of X-radiation lethality autologous marrow infusion in dogs. *Blood*, 13, 1168, 1958.
2. Mannick J., Lochte H., Ashley C. et al. Autograft of bone marrow in dogs after lethal total-body irradiation. *Blood*, 15, 255, 1960.
3. Thomas E., Storb R., Clift R. et al. Bonemarrow transplantation. *N. Engl. J. Med.*, 292,832, 1975.
4. Tavassoli M., Hardy C. Molecular basis of homing of intravenously transplanted stem cells to the marrow. *Blood*, 76, 1059, 1990.
5. Calvi L., Adams G., Weibrecht K. et al. Osteoblastic cells regulate the hematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425, 841, 2003.
6. Kopp H., Avezilla S., Hooper A., et al. Tie-2-activation contributes to hemangiogenic regeneration after myelosuppression. *Blood*, 106, 505, 2005.
7. Kucia M., Reza R., Miekus K., et al. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells*, 23, 879, 2005.
8. Liang Z., Wu T., Lou H. et al. Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4. *Cancer Res.*, 64, 4302, 2004.
9. LapidopT., Dar A., Kollet O. How do stem cells find their way home ? *Blood*, 106, 1901, 2005.
10. Avigdor A., Goichberg P., Shvitiel S., et al. CD44 and hyaluronic acid coope-

- rate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow. *Blood*, 104, 2981, 2004.
11. Peled A., Kollet O., Ponomaryov T., et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34+ cells : role in transendothelial/stromal migration and endgraftment in NOD/SCID mice. *Blood*, 95, 3289, 2000.
 12. Bonig H., Priestley G., Papayannopoulou T. Hierarchy of molecular pathway usage in bone marrow homing and its shift by cytokines. *Blood*, 107, 79, 2006.
 13. Chute J.P. Stem cell homing. *Curr. Opin. Hematol.*, 13, 399, 2006.
 14. Gong J. Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells *Science*, 199, 1443, 1978.
 15. Adams G., Chabner K., Alley I., et al. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature*, 439, 599, 2006.
 16. Kiel M., Yilmaz O., Iwashita T., et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial cell niches for stem cells. *Cell*, 121, 1109, 2005.
 17. Zhang J., Niu C., Ye L., et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425, 836, 2003.
 18. Heissig B., Hattori K., Dias S., et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of Kit-ligand. *Cell*, 109, 2002.

**MIDOLLO OSSEO:
UNA RICCA SORGENTE
DI CELLULE STAMINALI**

Il sistema delle cellule staminali ematopoietiche

Gian Luigi Castoldi

Sezione di Ematologia, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Ferrara

Il tessuto midollare risulta costituito da due distinte serie di elementi cellulari rispettivamente deputati alla produzione di cellule del sangue (*sistema emopoietico*) e al loro supporto funzionale (*sistema delle cellule mesenchimali*). Sebbene i rapporti fra questi due sistemi cellulari non siano stati ancora completamente delucidati, tuttavia è noto come esista una stretta interazione fra gli elementi dei due sistemi ed in particolare fra gli elementi differenziati in senso osteoblastico e le cellule progenitrici del sistema ematopoietico (Figura 1).

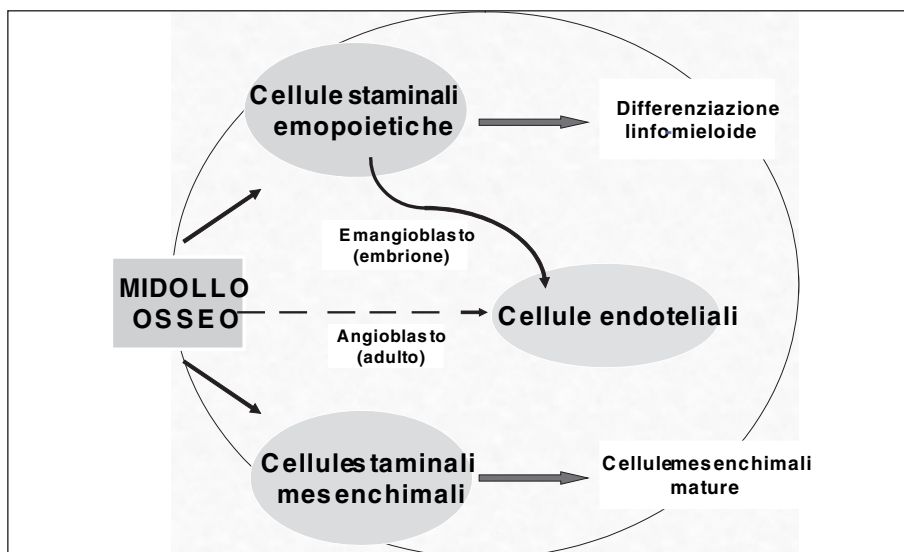


Fig. 1 - Schema illustrante la eterogenea composizione del tessuto midollare ove coesistono cellule ematopoietiche e linee differenziate ad esse correlate, accanto a cellule mesenchimali in grado di dare luogo ad elementi più maturi facenti parte dello stroma. La derivazione delle cellule endoteliali è controversa potendo originare da cellule mesenchimali oppure attraverso la via dell'angioblasto da progenitori ematopoietici.

Questa constatazione ha portato ad elaborare il concetto di “*nicchia*” e di “*microambiente induttivo*” (Schofield 1978, Moore 2004) per designare siti e meccanismi deputati al sostegno meccanico e funzionale delle cellule emopoietiche staminali.

Come è noto le cellule ematopoietiche iniziano il loro sviluppo a livello del sacco vitellino e della regione “aorto- gonado-mesonefro” per passare quindi al fegato che diviene il maggiore produttore di cellule emopoietiche sino al termine del secondo trimestre, allorquando le cellule staminali, attraverso la circolazione, raggiungono le cavità ossee a formare il midollo definitivo. Il passaggio delle cellule staminali emopoietiche al midollo osseo avviene precocemente nelle fasi di formazione dell’osso. L’abbozzo cartilagineo iniziale dell’osso viene infiltrato da parte di vasi e da cellule fagocitiche (condrocisti) finalizzate al rimodellamento cartilagineo. Il successivo arrivo degli osteoblasti precede l’impianto delle cellule staminali ematopoietiche che possono localizzarsi in prossimità degli osteoblasti a livello della superficie endosteale soltanto quando la matrice extracellulare ha cominciato a mineralizzarsi (Ca^{2+}).

Gli osteoblasti producono fattori di crescita e sono attivati da PTH (“parathyroid hormone” e da PTHrP (“*PTH-related protein*”) prodotta localmente (Calvi et al., 2003). A questo riguardo esiste tutta una serie di fattori e di rispettivi recettori che regolano l’adesione alla nicchia osteoblastica e la funzione delle cellule staminali (moltiplicazione ed automantenimento, differenziazione) (Figura 2).

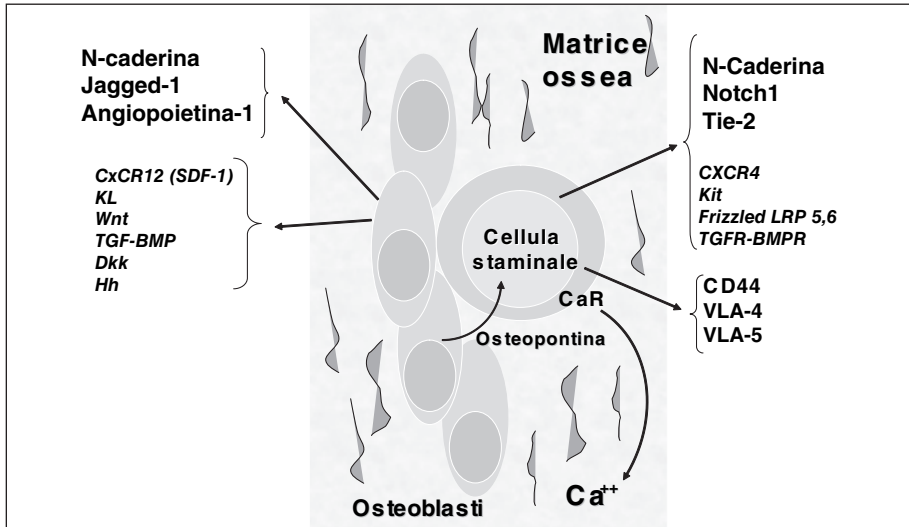


Fig. 2 - Schema illustrante i rapporti fra le cellule staminali emopoietiche e gli osteoblasti della nicchia endosteale. Ai lati della figura sono indicate le molecole elaborate rispettivamente dagli osteoblasti e dalle cellule staminali ai fini della loro interazione.

Legende: Jagged-1: ligando di Notch-1; Angiopoietina 1: ligando di Tie2 (recettore ad attività tirosinchinasi); CXCL12/SDF-1: Chemokine-stromal cell-derived factor-1 (ligando del recettore CXCR4 (CD184)); KL: Kit ligando; Wnt :Wingless; TGF-BMP: Transforming growth factor- β family e Bone morphogenic protein family; (R:receptor); LRP5,6: Lipoprotein-related receptor proteins 5 e 6; Dkk: Dickkopf; Hh : Hedgehog; VLA 4,5: Very late antigen 4,5 (integrine); CaR: Ca^{2+} sensing receptor.

I meccanismi di autorinnovamento delle cellule staminali e di commitment alle diverse filiere ematopoietiche sono governati dalla interazione con numerosi segnali esterni, quali ad es., Notch-1 (fattore legato a “*Drosophila neurogenic locus* “necessario per l’orientamento della linea cellulare nell’embriogenesi), e Wnt (“*Wingless*”). L’espressione costituzionale o indotta di Notch -1 (che interagisce con il suo ligando Jagged-1) promuove l’automantenimento delle cellule staminali emopoietiche e dei loro progenitori nella nicchia osteoblastica.

Per quanto attiene a Wnt questa famiglia di molecole espresse a livello di diversi tessuti, è in grado di interreagire con recettori “frizzled” e co-recettori LRP5,6 (“low-density lipoprotein-receptor-related protein”).

Lungo questa via esse possono attivare almeno tre distinti percorsi intracellulari di cui il principale è collegato alla stabilizzazione della β -catenina (“canonical β -catenin pathway”) oppure attivare segnali mediati dalla calcio-protein kinasi C (“non canonical Wnt-calcium pathway”) o dalla Jun N-terminal kinasi (“Wnt-c-Jun N-terminal kinase”) (Scheller et al., 2006, Kirstetter et al., 2006) (Figura 3). In condizioni normali, in assenza della attivazione da parte di Wnt della via di trasmissione dei segnali viene consentito alla β -catenina di associarsi alle caderine, promuovendo l’adesione delle cellule stesse nella nicchia e di interagire con microfilamenti di actina del citoscheletro controllando la foggia cellulare. Se, tuttavia, in seguito alla attivazione di Wnt, viene a mancare la degradazione intracellulare di β -catenina da parte del proteasoma (Figura 3), si produce un accu-

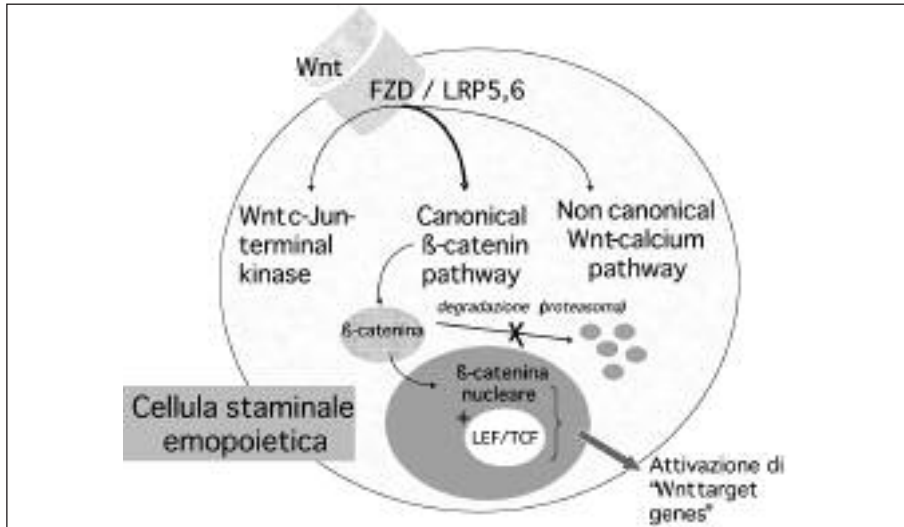


Fig. 3 - Schema delle modalità di attivazione delle proteine Wnt attraverso tre differenti vie di cui la principale (“canonical pathway”) è rappresentata dal coinvolgimento della β -catenina.

Legende: LEF: Lymphoid enhancer factor; TCF: T-cell factor; Wnt: Wingless (famiglia di molecole ricche in cisteina, associate alla matrice extracellulare); FZD: Frizzled; LRP5,6: Low-density lipoprotein receptor-related protein-5,6.

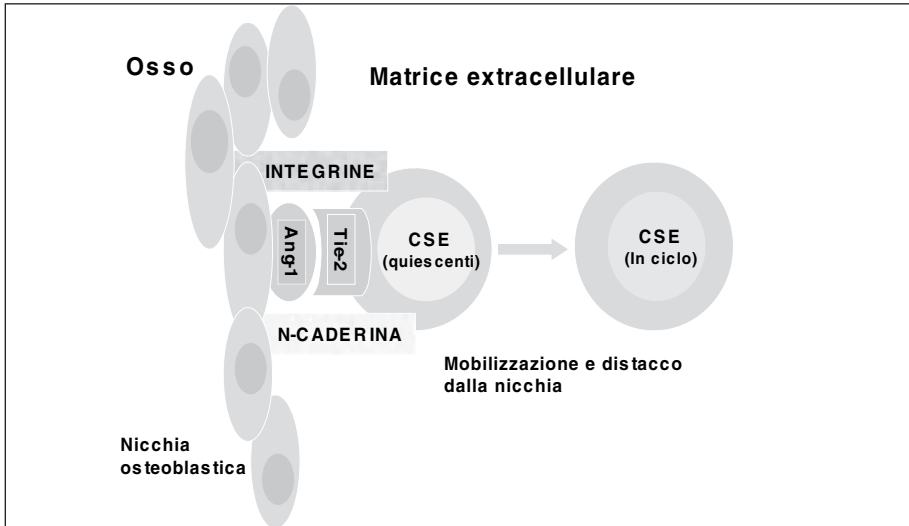


Fig. 4 - Schema della adesione delle cellule staminali (attraverso Ang-1/Tie2) agli osteoblasti della nicchia emopoietica con la mediazione di integrine e N-caderina. Gli stretti legami consentono, per effetto della adesione, la quiescenza delle cellule e la loro sopravvivenza. Il distacco delle cellule staminali dalla nicchia avviene per il passaggio dallo stato di quiescenza delle stesse ad uno stato di attivazione che consente la loro migrazione nelle nicchie vascolari ed, infine, in circolo. (Modificato da Arai et al., 2005).

Legende: CSE: Cellula staminale emopoietica; Ang-1: Angiopoietina 1.

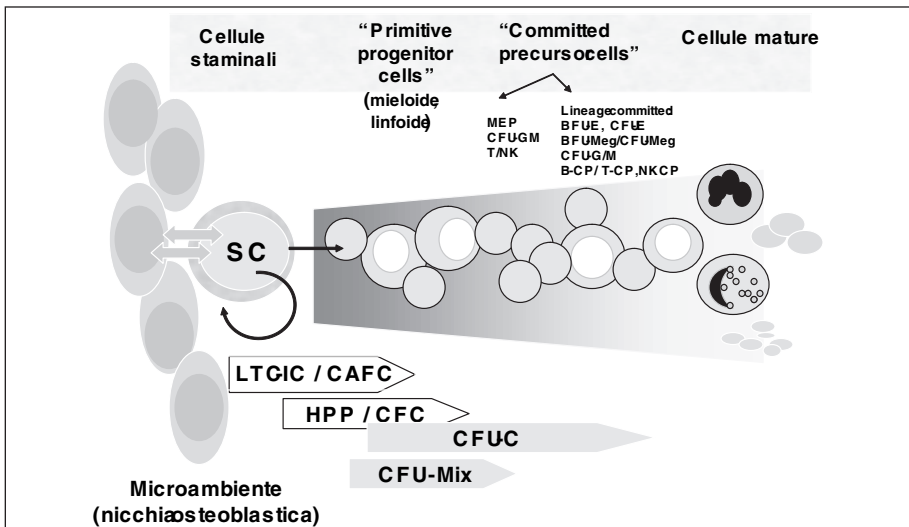


Fig. 5 - Schema della articolazione della emopoiesi a partire dalle cellule staminali legate al microambiente midollare. La produzione di cellule mature passa, per amplificazione, attraverso vari stadi di progenitori dotati di potenzialità differenziate diversificate (modificato da R. Hoffman, 2000).

Legende: LTC-IC: "Long-term culture-initiating cells"/ CAFC: "Cobblestone area forming cells"; HPP/CFC: "High proliferative potential/Colony forming cells"; CFU-C: "Colony forming unit- in culture; CFU-Mix: "Colony forming Unit –multilineage (myeloid & lymphoid)." Nei riquadri a freccia (in grigio) sono rappresentati progenitori dotati di "short-term repopulating activity".

mulo di β -catenine che passano nel nucleo interagendo con le proteine LEF/TCF ed attivando la trascrizione dei geni correlati.

La possibilità che cellule staminali emopoietiche possano contribuire a localizzazioni extramidollari (come nel caso di alcune malattie mieloproliferative) lascia adito all'esistenza di altre nicchie per le cellule staminali in tessuti diversi dal midollo osseo ed in assenza di strutture osteoblastiche di supporto.

In questi tessuti le cellule staminali potrebbero essere reclutate, come nel midollo, in "nicchie vascolari" (Heissig, 2002, Kiel et al. 2005). Poichè le cellule staminali esprimono un recettore sensibile al calcio (CaR: "calcium sensing-receptor") che le guiderebbe nella nicchia osteoblastica, l'assenza di questo recettore consentirebbe la localizzazione delle cellule staminali in tessuti diversi dall'osso e quindi indipendenti da una matrice mineralizzata.

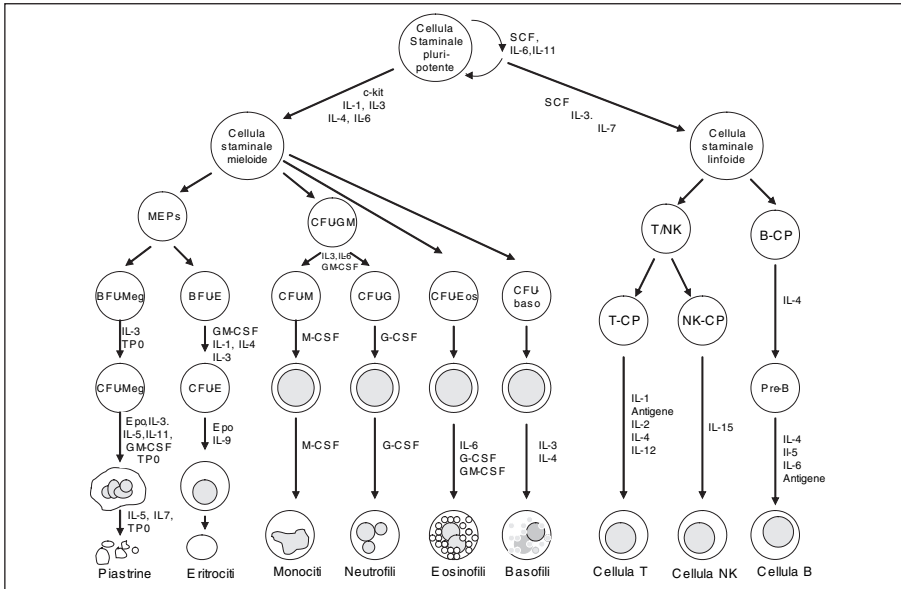


Fig. 6 - Principali stadi della emopoiesi. Lo sviluppo delle diverse filiere proliferative prende origine da un progenitore pluripotente ("multipotent stem cell") dotato sia di autorinnovo che di differenziazione verso due progenitori staminali comuni, rispettivamente la cellula staminale mieloide e la cellula staminale linfoidi ("primitive progenitor cells"). Entrambi questi progenitori danno luogo a cellule progenitrici ancora più differenziate ("committed precursor cells") quali quelle a potenzialità bifilari (MEP: "Megakaryocyte-erythroid progenitor", CFU-GM: "Colony forming unit- granulo-monocytic" e T/NK: "T-cells and natural killer cells") oltre al precursore delle cellule B (B-CP: "B-progenitor cell, pre-pre B cell"). Alla fine queste cellule formano precursori unifilari ("lineage-committed cells") che producono rispettivamente eritrociti megacariociti/piastrine, monociti/macrofagi, granulociti neutrofili, eosinofili, basofili, linfociti T, NK e B. Presiedono a queste fasi differenziative numerosi fattori di crescita e citochine che intervengono nelle varie fasi di maturazione delle singole filiere.

Legende: SCF: "Stem Cell Factor" c-kit: recettore per SCF; BFU-Meg: "Burst Forming Unit-Megakaryocytic"; CFU-Meg: "Colony Forming Unit-Megakaryocytic"; BFU-E: "Burst Forming Unit-Erythroid"; CFU-E: "Colony Forming Unit-Erythroid"; Epo: "Eritropoietina"; TPO: "Trombopoietina"; CFU-M: "Colony Forming Unit-Macrophage"; CFU-G: "Colony Forming Unit-Granulocyte"; GM-CSF: "Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor"; T-CP: "T-Cell Progenitor"; NK-CP: "NK-Cell Progenitor"

Kiel et al. (2005) hanno dimostrato che molte cellule staminali emopoietiche, oltre che nelle nicchie endosteali, sono collocate in prossimità di cellule endoteliali a livello di midollo e milza e che probabilmente questi due tipi di nicchie regolano non solo il traffico delle cellule staminali, ma anche la loro capacità di proliferazione e differenziazione.

Se la nicchia osteoblastica rappresenta un microambiente ideale per la sopravvivenza e la quiescenza delle cellule staminali emopoietiche (Arai et al., 2004), l'attivazione di queste ultime coincide con la loro fuoriuscita dalla nicchia (Nervi et al., 2006, Valgimigli et al. 2005) Questo passaggio corrisponde anche alla perdita della loro capacità di ripopolamento a lungo termine (Arai et al. 2005) ed è mediato dalla debole espressione di alcune molecole di adesione quali CX CR4 (Dlubeck et al., 2006) e dalla attività di alcuni fattori di crescita (G-CSF) (Nervi et al., 2006) (Figura 4).

Le cellule staminali emopoietiche maturanti (Figura 5) raggiungono quindi la circolazione attraverso le fenestrature dei sinusoidi.

La ulteriore produzione e differenziazione è frutto dell'intervento di numerose citochine e fattori di crescita che influenzano le singole filiere (Epo, TPO, GM- e G-CSF, interleuchine) (Kaushansky, 2006) (Figura 6). Alcuni di questi hanno effetti di "ridondanza" potendo influire su più filiere contemporaneamente o graduando i loro effetti su filiere diverse, in modo da assicurare la loro azione a livello delle cellule bersaglio anche in condizioni di ridotta produzione (Metcalf, 1993). L'organizzazione della emopoiesi sinora descritta è di tipo classico gerarchico, tuttavia altri modelli sono oggi aperti alla discussione (modello stocastico, modello sequenziale) (Quesenberry, 2006).

Bibliografia

1. Adams GB. Stem cell engraftment and the endosteal niche is specified by the calcium sensing receptor. *Nature*, 439: 599-603, 2006.
2. Adams GB., Scadden DT. The haemopoietic stem cell in its place. *Nature Immunol.*, 7: 333-337, 2006.
3. Arai F. Hirao A., Ohmura M., Sato H., Matsuoka S., Takubo K., Ito K., Koh G.Y., Suda T. Tie2/Angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, 118: 149-161, 2004.
4. Calvi LM., Adams GB., Weibrecht KW., Weber JM., Olson DP., Knight MC., Martin RP., Schipani E., Divieti P., Bringhurst FR., Milner LA., Kronenberg HM., Scadden DT. Osteoblastic cells regulate the hematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425: 841-846, 2003.
5. Castoldi GL., Cuneo A, Rigolin GM. Recruitment of stem cells into angiogenesis. In: Staton C., Lewis C., Bicknell R. (eds.): *Angiogenesis assays: A critical appraisal of current techniques*. J.Wiley , London, 2006 (in press).
6. Dazzi F., Ramasamy R., Glennie S., Jones SP., Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev.*, 20: 161-171, 2006.
7. Duncan AW., Rattis FM., DiMascio LN., Congdon KI., Pazianos G., Zhao C., Yoon K., Cook JM., Willert K., Gaiano N., Reya T. Integration of Notch

- and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nature Immunol.* 6: 314-322, 2005.
8. Heissig B., Hattori K., Dias S., Friedrich M., Ferris B., Hackett NR., Crystal RG., Besmer P., Lyden D., Moore MAS., Werb Z., Rafil S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*, 109: 625-637, 2002.
 9. Kaushansky K. Lineage specific hematopoietic growth factors. *N. Engl. J. Med.*, 354: 2034-20454, 2006.
 10. Kiel MJ., Yilmaz OH., Iwashita T., Yilmaz OH., Terhorst C., Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, 121: 1109-1121, 2005.
 11. Kirstetter P., Anderson K., Porse BT., Jacobsen SEW., Nerlov C. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nature Immunol.*, 7: 1048-1056, 2006.
 12. Jiang Y., Jahagirdar BN., Reinhardt RL., Schwartz RE., Keene CD., Ortiz-Gonzalez XR., Reyes M., Lenvik T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low WC., Largaespada D.A., Verfaillie C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418: 41-49, 2002.
 13. Lakshminpathy U., Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood Rev.* 19: 29-38, 2005.
 14. Metcalf D. Hematopoietic regulators: Redundancy or subtlety?. *Blood*, 82: 3515- 3523, 1993.
 15. Moore KA., Lemischka R. Stem cells and their niches. *Science*, 311: 1880-1885, 2006.
 16. Nervi B., Link C., Di Persio JF. Cytokines and hemopoietic stem cell mobilization. *J.Cell.Biochem.*, 99: 690- 705, 2006.
 17. Quesenberry PJ. The continuum model of marrow stem cell regulation. *Curr.Opin.Hematol.*, 13: 216-221, 2006.
 18. Scadden DT. The stem-cell niche a an entity of action. *Nature*, 441: 1075-1079, 2006.
 19. Scheller M., Huelsken J., Rosenbauer F., Taketo MM., Birchmeier W., Tenen DG., Leutz A. Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive β -catenin activation. *Nature Immunol.* 7: 1037-1047, 2006.
 20. Trowbridge J.J., Moon R.T. Bhatia M.: Hematopoietic stem cell biology: too much of a Wnt thing. *Nature Immunology*, 7: 1021-1023, 2006.
 21. Valgimigli M., Rigolin G.M., Cittanti C., Malagutti R., Curello S., Percolo G., Bugli A.M., Della Porta M., Zenone Bragotti L., Ansani L., Mauro E., Lanfranchi A., Giganti M., Feggi L., Castoldi GL. Ferrari R. Use of granulocyte-colony stimulating.
 22. Factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell mobilization. *Europ. Heart J.* 26: 1838-1845, 2005.

Progenitori endoteliali e loro mobilizzazione

Paola Romagnani

Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Università di Firenze, Policlinico Careggi

Nel sangue periferico di soggetti adulti è stato recentemente individuato un sottotipo di cellule circolanti con proprietà simili a quelle degli angioblasti embrionali. Queste cellule, derivate dal midollo osseo, hanno la capacità di proliferare e differenziare in cellule endoteliali mature e sono pertanto definite cellule progenitrici endoteliali (EPC) (1). Le EPC sono state caratterizzate per la presenza di tre marcatori: CD133 (originariamente definito AC133), CD34 e il recettore 2 per il fattore di crescita endoteliale (VEGFR-2) o KDR (2, 3). Le cellule CD133⁺, CD34⁺ e VEGFR-2⁺ sono localizzate soprattutto nel midollo osseo, mentre dopo il loro ingresso nel circolo sanguigno, perdono l'espressione di membrana di CD133, mantenendo la positività per il VEGFR-2 e per il CD34 (4). A seguito del processo differenziativo in cellule endoteliali mature (EC), le EPC acquisiscono il fattore di von Willebrand (vWf) ed altri marcatori endoteliali. Dati presenti in letteratura dimostrano che le popolazioni di EPC possono essere isolate da cellule mononucleate (MNC) circolanti, da popolazioni purificate di cellule CD34⁺ o anche da cellule CD14⁺ (4). Inoltre, studi recenti sull'uomo e sugli animali hanno dimostrato l'abilità delle EPC di migliorare la funzione degli organi ischemici, attraverso l'induzione e la modulazione della vasculogenesi nelle aree con ridotta ossigenazione o attraverso la riendotelizzazione dei vasi danneggiati (1). I segnali che promuovono la mobilizzazione delle EPC nel circolo non sono ancora del tutto conosciuti, ma includono fattori di crescita angiogenici, i cui livelli aumentano a livello periferico in caso di ischemia o di danneggiamento di vasi. Tra questi fattori uno dei più noti è il VEGF, capace non solo di promuovere la mobilizzazione delle EPC, ma anche la loro incorporazione nei siti di vascolarizzazione (5, 6). Un altro fattore, indotto dall'ipossia, coinvolto nel richiamo e nella migrazione delle EPC dal midollo al sito del danno è lo stromal derived factor-1 (SDF-1), ligando del recettore CXCR4 espresso dalle EPC (7). Il rilascio di EPC *in vivo* è anche stimolato dalla somministrazione di citochine come G(M)-CSF (fattore stimolante le colonie granulocitarie) (8). Il numero di EPC presenti in un soggetto può essere influenzato anche da numerosi farmaci e condizioni patologiche. Ad esempio, il loro numero e la loro migrazione è ridotto in pazienti con

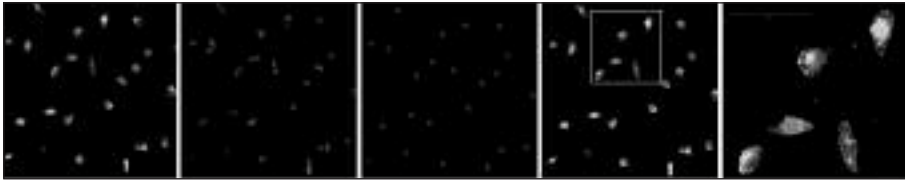


Fig. 1 - Microscopia confocale condotta su cellule MNC dopo 5 giorni di coltura. A) Legame di Ulex-lectin-FITC (verde); B) "Uptake" di LDL acetilate-DiI (rosso); C) Colorazione dei nuclei con Topro-3 (blu); D) Immagine ottenuta dalla sovrapposizione di A, B, e C ed E) Ingrandimento dell'immagine mostrata in D. Modificato da Romagnani P et al. *Circ Res.* 2005 Aug 19; 97 (4): 314-322.

fattori di rischio per malattie cardiovascolari ischemiche, mentre si osserva un rapido aumento di EPC nel circolo sistemico in caso di infarto del miocardio o traumi vascolari (9, 10, 11). Trattamenti farmacologici, come le statine e gli inibitori della 3-idrossi-3-metilglutarilCoA reductasi, portano ad un incremento di EPC (12) e questo potrebbe contribuire all'angiogenesi e alla riendotelizzazione che è stata osservata dopo la somministrazione di tali farmaci. Nel nostro studio abbiamo condotto una serie di esperimenti per definire in modo più dettagliato le caratteristiche di questa popolazione cellulare e per dimostrare quale tipo cellulare presente tra le cellule mononucleate di sangue periferico (PBMNC) contribuisca a generare le EPC. Quindi le MNC, prelevate e separate da sangue periferico sono state coltivate su piastre ricoperte con fibronectina per 10-12 giorni in presenza di VEGF, fattore di crescita caratteristico delle cellule endoteliali. Al quinto giorno di coltura le MNC danno origine ad una popolazione di cellule aderenti LDL acetilate⁺/Ulex-lectina⁺ (Figura 1) caratteristiche tipiche delle cellule EPC (13,14).

Abbiamo analizzato, inoltre, la presenza di una serie di proteine di superficie mediante citofluorimetria nelle PBMNC al giorno 0 e dopo 5 giorni di coltura (Tabella 1). Al giorno 5 si osserva un aumento nella proporzione delle cellule CD14⁺, CD31⁺, CD86⁺, CD11c⁺, HLA-DR⁺, ma non delle cellule CD34⁺.

Tab. 1 - Espressione di marcatori di superficie da parte di PBMNC prima e dopo la loro differenziazione in EPC valutata mediante analisi FACS. I valori riportati sono valori medi \pm SE ottenuti in 7 esperimenti.

Marcatori di superficie (%)	PBMNCs	EPC
CD1a	0.05 \pm 0.05	2.3 \pm 0.7
CD35	58.1 \pm 0.1	7.9 \pm 0.9*
CD11c	32.9 \pm 0.4	86.0 \pm 1.9*
CD14	18.7 \pm 1.5	84.9 \pm 2.0*
CD16	17.4 \pm 1.3	81.8 \pm 2.8*
CD19	6.8 \pm 1.0	2.7 \pm 0.6*
CD31	60.5 \pm 0.8	84.0 \pm 4.8*
CD34	0.2 \pm 0.05	0.7 \pm 0.2
CD45	95.4 \pm 0.2	98.2 \pm 0.4
CD80	0.7 \pm 0.2	3.1 \pm 0.1
CD86	19.2 \pm 1.0	74.3 \pm 6.6*
CD10	58.2 \pm 1.2	83.1 \pm 1.8*
CD133	0.2 \pm 0.05	0.6 \pm 0.3
HLA-DR	38.3 \pm 0.2	86.5 \pm 3.2*

Questi risultati sono stati confermati dall'analisi dei livelli di mRNA effettuata mediante Real Time (RT) PCR, unica eccezione è stata una elevata espressione dell'mRNA del CD34 che appariva in contrasto con la mancanza della proteina sulla superficie delle cellule. Per verificare se le cellule esprimessero il CD34 a livelli al di sotto della sensibilità dei classici metodi citofluorimetrici è stata utilizzata una tecnica altamente sensibile che utilizza anticorpi magnetofluorescenti coniugati a liposomi (ACMFL) che è in grado di aumentare l'intensità del segnale di fluorescenza da 100 a 1000 volte rispetto alle metodiche convenzionali. Utilizzando questa tecnica è stato possibile evidenziare che tutte le EPC esprimevano sulla loro superficie non solo il CD14, ma anche il CD34 (Figura 2).

Successivamente, siamo andati a cercare l'esistenza della popolazione CD14+CD34^{low} a livello del sangue periferico. Abbiamo così osservato che utilizzando la tecnica ACMFL, una percentuale variabile da soggetto a soggetto e che può costituire dal 10 al 80% dei monociti circolanti, è rappresentato da cellule CD14+CD34^{low}. In seguito le cellule CD14+ circolanti totali sono state separate mediante ACMFL in CD34- e CD34^{low} (Figura 3) e coltivate in EGM-MV con aggiunta di VEGF.

Per verificare se le cellule CD14+CD34^{low} possedessero markers fenotipici di cellula staminale abbiamo valutato l'espressione di Nanog, fattore di trascrizione che gioca un ruolo chiave nel self-renewal e nel mantenimento della pluripotenza (15), di Oct-4, marcatore di cellula embrionale staminale (16) e di un marcatore di cellula staminale (SC) adulta, Bmi-1 (17). L'analisi quantitativa dell'espressione di questi marcatori è stata valutata, mediante RT-PCR sia prima della coltura (0 days), sia al quinto che all'undicesimo giorno di coltura. Nelle cellule CD14+CD34-, utilizzate come controllo, sono stati rivelati bassi livelli di marcatori di cellula staminale e assenza di marcatori caratteristici delle cellule endoteliali (KDR, vWf) (Figura 4). Al contrario Nanog, Oct4 e Bmi-1 sono risultati espressi in elevate quantità nelle cellule CD14+CD34^{low}, in particolare i loro livel-

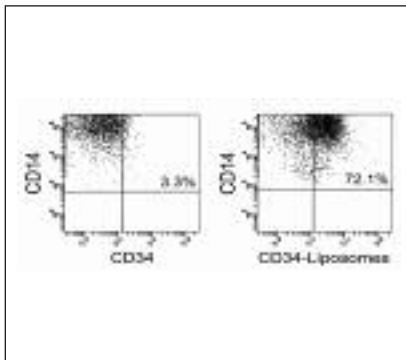


Fig. 2 - Espressione di CD34 sulla superficie di EPC, utilizzando una tecnica citofluorimetrica convenzionale (a sinistra) e con la tecnica ACMFL (a destra). Modificato da Romagnani P et al. *Circ Res.* 2005 Aug 19; 97 (4): 314-322.

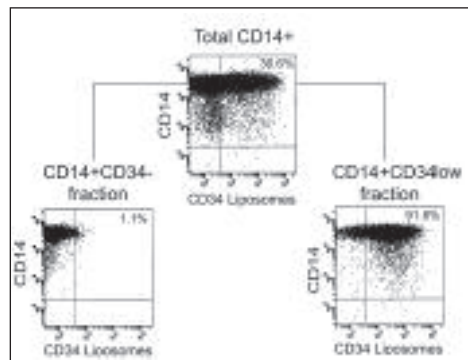


Fig. 3 - Popolazioni di monociti circolanti analizzate con la tecnica ACMFL mostrano la presenza di una percentuale di cellule CD14+CD34^{low}. Modificato da Romagnani P et al. *Circ Res.* 2005 Aug 19; 97 (4): 314-322.

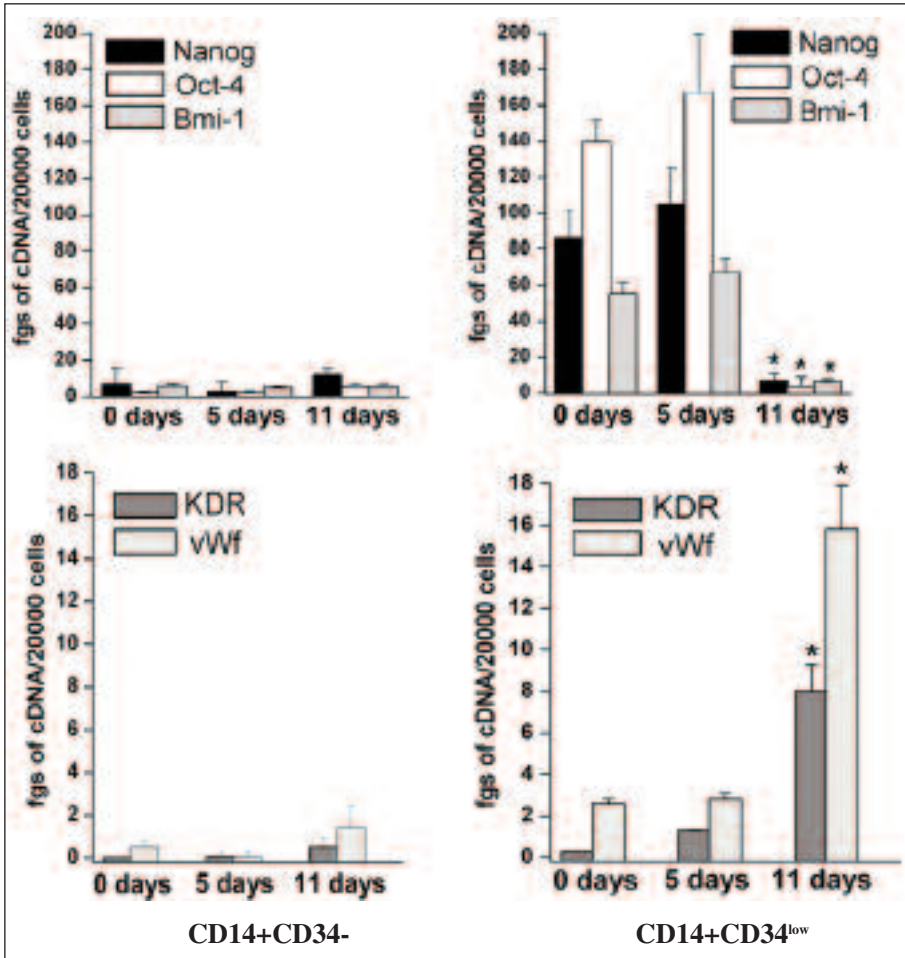


Fig. 4 - Espressione di Nanog, Oct-4 e Bmi-1 in cellule CD14+CD34^{low} e cellule CD14+CD34⁻ e loro differenziamento in cellule endoteliali. Modificato da Romagnani P et al. *Circ Res.* 2005 Aug 19; 97 (4): 314-322.

li di mRNA crescono fino al quinto giorno di coltura e poi diminuiscono fino a divenire indosabili all'undicesimo giorno, quando le cellule acquisiscono markers fenotipici di cellula endoteliale (Figura 4).

Per fornire una dimostrazione diretta che le cellule CD14+CD34^{low} circolanti possedessero anche caratteristiche funzionali di SC, entrambe le popolazioni CD14+CD34^{low} e CD14+CD34⁻ sono state valutate per il loro potenziale proliferativo, per la loro capacità di dare origine a cloni e per il potenziale multidifferenziativo. Solo le cellule CD14+CD34^{low} sono in grado di proliferare in risposta a stem cell factor (SCF), fms-like tyrosine kinase 3-ligand (Flt3-L) e alla trombopoietina, come è stato rivelato con la tecnica CFDA-SE, e sono capaci di originare cloni con un'efficienza di clonazione del 27% ± 6%, mentre l'efficienza di

clonazione delle CD14+CD34⁻ è risultata irrilevante (0,8% ± 0,3%). Infine, le cellule CD14+CD34^{low} isolate e coltivate in appropriate condizioni, sono risultate capaci di differenziare non solo in EC mature, ma anche in osteoblasti, adipociti e cellule neuronali. La differenziazione in osteoblasti è stata dimostrata dalla positività alla fosfatasi alcalina e dalla formazione di depositi di calcio evidenziati con la colorazione Alizarin Red. Inoltre, mentre le cellule CD14+CD34^{low} indifferenziate non esprimono i fattori di trascrizione osso-specifici Osterix e Runx2, la loro espressione è stata marcatamente up-regolata dopo il trattamento differenziativo. La differenziazione nel fenotipo adipogenico è stata confermata dalle caratteristiche morfologiche delle cellule e dalla colorazione oil red O che evidenzia i vacuoli lipidici, completamente assenti nelle cellule indifferenziate. In aggiunta, utilizzando real-time RT-PCR, sono stati riscontrati elevati livelli di AP-2 e PPAR- γ , due fattori di trascrizione adipocita-specifici, assenti nelle cellule CD14+CD34^{low} indifferenziate. Infine, le cellule CD14+CD34^{low} indifferenziate non esprimono la proteina gliofibrillare acida (GFAP) e il neurofilamento 200 (NF200) o l'enzima neuronale-specifico, mentre l'espressione di tutti questi marcatori è notevolmente up-regolata dopo il trattamento induttivo.

In questo studio è stato, quindi, identificato un subset di monociti CD14+CD34^{low} (0,6%-8,5% del totale dei leucociti) che rappresenta una risorsa di EPC ottenibili da sangue periferico e che, probabilmente, costituisce una sottopopolazione circolante di SC pluripotenti. È stata infatti valutata la presenza di cellule CD14+CD34^{low} anche nel midollo osseo; utilizzando la tecnica ACMFL tutte le cellule CD14+ appaiono esprimere il CD34, suggerendo, quindi, che le cellule CD14+CD34^{low} circolanti risultano probabilmente dalla migrazione di una popolazione già esistente a livello del midollo osseo. I risultati di questo studio, inoltre, suggeriscono la possibilità che l'isolamento e la purificazione di queste cellule possa essere uno strumento utile per ottenere un elevato numero di EPC utilizzabili nella riparazione del danno ischemico.

Bibliografia

1. Kocher AA., Schuster MD., Szabolcs MJ., et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 2001; 7: 430-436.
2. Peichev M., Naiyer AJ., Pereira D., et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 200; 95: 952-958.
3. Yin AH., Miraglia S., Zanjani ED., et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 1997; 90: 5002-5012.
4. Reyes M., Dudek A., Jahagirdar B., et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest.* 109: 337-346.
5. Kalka C., Masuda H., Takahashi T., et al. 2000. Vascular endothelial growth factor gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res.* 2002; 86: 1198-1202.

6. Mihail Hristov, Wolfgang Erl, Peter C. Weber. Endothelial Progenitor Cells, mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1185-1189.
7. Yamauchi J., Kusano KF., Kawamoto A., et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation.* 2003; 107: 1322-1328.
8. Vasa M., Fichtlscherer S., Adler K., et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 2001; 89: e1_e7.
9. Shintani S., Murohara T., Ikeda H., et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001; 103: 2776-2779.
10. Takahashi T., Kalka C., Masuda H., et al. Ischemia - and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 1999; 5: 434-438.
11. Beltrami AP., Urbanek K., Kajstura J. et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2001; 344: 1750-7. [PMID: 11396441].
12. Vasa M., Fichtlscherer S., Adler K., et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation.* 2001; 103: 2885-2890.
13. Szmitko PE., Fedak PWM., Weisel RD., et al. Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. *Circulation.* 2003; 107: 3093-3100.
14. Hristov M., Erl FW., Webber PC. Endothelial progenitor cells. Isolation and characterization. *Trends Cardiovasc Med.* 2003; 13: 201-206.
15. Chambers I., Colby D., Robertson M., et al. Functional expression cloning of Nanog a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell.* 2003; 113: 643-655.
16. Pesce M., Scholer HR. gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells.* 2001; 19: 271-278.
17. Iwama A., Oguro H., Negishi M., et al. Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1. *Immunity.* 2004; 21: 843-851.

Heterogeneous populations of stem cells reside in the bone marrow: which therapeutic implications?

Mariusz Z. Ratajczak

Stem Cell Biology Program at James Graham Brown Cancer Center,
University of Louisville, USA

Developmental accumulation of stem cells in the bone marrow

Bone marrow (BM) was for many years primarily envisioned as the “home organ” of hematopoietic stem cells (HSC). However, recent research indicates that BM in addition to HSC also contains a heterogeneous population of non-hematopoietic stem cells. These cells have been variously described in the literature as:

- 1) endothelial progenitor cells (EPC) (1, 2);
- 2) mesenchymal stem cells (MSC) (3, 4);
- 3) multipotent adult progenitor cells (MAPC) (5);
- 4) marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells (6);
- 5) unrestricted somatic stem cells (USSC) (7);
- 6) very small embryonic-like (VSEL) stem cells (8).

It is likely that in many cases similar or overlapping populations of primitive stem cells in the BM were detected using different experimental strategies and hence were assigned different names. Unexpectedly, it was found that the BM could also be a potential source of precursors of germ cells (oocytes and spermatogonial cells) (9, 10).

It is still unclear whether BM contains a population of pluripotent stem cells (PSC). Several attempts have been made to identify such a cell in the BM that at the single cell level in vitro could give rise to cells from all three germ layers (meso-, ecto- and endoderm) and to contribute to the development of multiple organs and tissues in vivo after injection into the developing blastocyst.

It is hypothesized that the presence of these various populations of stem cells in the BM is a result of the “developmental migration” of stem cells during ontogenesis and the presence of the permissive environment that attracts these cells to the BM tissue. HSC and other non-hematopoietic stem cells are actively chemoattracted by factors secreted by BM stroma cells and osteoblasts (e.g., stromal

derived factor-1, SDF-1, hepatocyte growth factor, HGF) and colonize marrow by the end of the second and the beginning of the third trimester of gestation (11-14). Accumulating evidence suggests that these non-hematopoietic stem cells residing in the BM play some role in the homeostasis/turnover of peripheral tissues and if needed could be released/mobilized from the BM into circulation during tissue injury and stress, facilitating the regeneration of damaged organs (15-23).

Concept of plasticity of HSC explained by a presence of heterogenous population of stem cells in BM.

Several investigators in the past few years have demonstrated that BM-derived cells can contribute to the regeneration of various organs and tissues (22, 24-32). These observations were mainly explained by the hypothesis that HSC are “plastic” and thus could trans-dedifferentiate into stem cells committed for various non-hematopoietic organs and tissues (33, 34). For this phenomenon to occur requires:

- 1) a parallel switch of commitment for HSC in the compartment of monopotent stem cells or
- 2) as postulated, a step back in the differentiation process of HSC with their de-differentiation into multipotent (one germ layer-committed) or even pluripotent (three germ layer-committed) stem cells.

This hypothetical possibility that HSC are plastic and able to trans-dedifferentiate raised much hope that HSC isolated from BM, mobilized peripheral blood (mPB) or cord blood (CB) could become a universal source of stem cells for tissue/organ repair. This, excitement was bolstered at that time by several reports that demonstrated the remarkable regenerative potential of “HSC” in animal models, for example, after heart infarct stroke (35), spinal cord injury (36) and liver damage (37).

However since these first exciting and promising reports, the role of BM stem cells in the repair of damaged organs has become controversial (38-40). Further experiments with highly purified populations of HSC showed them not to be effective in regenerating damaged heart (41) or brain (42). In response to these unexpected results the scientific community became polarized in its view of the concept of stem cell plasticity.

These obvious discrepancies in published results could be explained by differences in the tissue injury models employed and/or problems in detection of tissue chimerism. However, several other possibilities have been proposed to explain these discrepancies (Table 1).

First, it is possible that, for trans-dedifferentiation of HSC to occur, the appropriate tissue damage models are required which are able to create the permissive “pro-plastic” environment enriched in factors needed to promote this process. Hypothetically such a “permissive” environment could induce epigenetic changes in HSC and thus force them to change lineage commitment (43, 44). Second, it has been postulated that some plasticity data could be explained simply by the phenomenon of cell fusion (45, 49). Accordingly, the donor-derived cells

Tab. 1 - Alternative explanations of the phenomenon of trans-differentiation or plasticity of HSC.

Epigenetic changes	Factors present in the environment of damaged organs induce epigenetic changes in genes that regulate pluripotency of HSC (involvement of changes in DNA methylation, acetylation of histones). More evidence needed that it is a robust and reproducible phenomenon.
Cell fusion	The relatively rare phenomenon by which infused HSC may fuse with cells in damaged tissues and form heterokaryons. Heterokaryons created this way express markers of both donor and recipient cells (pseudochimerism).
Paracrine stimulation	HSC are a source of different trophic and angiopoietic factors that may promote tissue/organ repair.
Microvesicles-dependent transfer of molecules	Some of the plasticity data could be explained by a transient modification of cell phenotype by the transfer of receptors, proteins and mRNA between HSC and damaged cells by membrane-derived microvesicles.
Heterologous population of stem cells in BM	In addition to HSC, BM contains other stem cell populations. Regeneration could be explained by the presence of endothelial progenitors that promote neovasculogenesis and also by the presence of other stem cells including PSC. This could also explain the loss of contribution of BM cells to organ regeneration with use of highly purified populations of HSC.

observed in damaged tissues which express non-hematopoietic markers could be in fact heterokaryons, the result of the fusion of BM-derived stem cells with somatic host cells in the damaged organs. Both cell fusion and epigenetic changes, however, are extremely rare and randomly occurring events that certainly could not fully account for all of the positive trans-differentiation data published. Furthermore, fusion as a major contributor to the observed donor-derived chimerism has been excluded in several recently published studies (50-52).

Another possible explanation of some of the benefits observed in organ/tissue regeneration after infusion of BM-cells is the result of paracrine effects. It is well known that BM-derived cells are a source of several trophic cytokines and growth factors and that these factors if released from these cells could promote tissue repair and vascularization (53). Furthermore, it has been recently shown that cells may transiently modify the phenotype of neighboring cells by transferring surface receptors, intracellular proteins and mRNA in mechanisms that involve exchange of cell-membrane-derived microvesicles (54, 55). Shedding of membrane-derived microvesicles is a physiological phenomenon that accompanies cell growth and cell activation e.g., hypoxia or oxidative injury (56-59). Thus, microvesicle-mediated exchange of receptors, proteins and mRNA between infused BM cells and cells in damaged organs could temporarily modify the phenotype of cells in the damaged organ. An open question is whether microvesicles can also exchange some of the reporter-gene markers employed to detect tissue chimerism (e.g., GFP or β -galactosidase).

Surprisingly, during all of these deliberations concerning stem cell plasticity (Table 1) and the potential contribution of BM-derived cells to organ regeneration, the concept that BM may contain heterogeneous populations of stem cells

was not taken into careful consideration (59, 60). We postulate that regeneration studies demonstrating a contribution of donor-derived BM, mPB or CB cells to non-hematopoietic tissues without addressing this possibility (by including the appropriate controls) has led to misleading interpretations. It is reasonable to assume that the presence of heterogeneous populations of stem cells in BM, mPB or CB would be considered before experimental evidence is interpreted as plasticity or trans-differentiation of HSC (61).

Hence the presence of non-hematopoietic stem cells in BM rather than “trans-differentiation” of HSC, could explain some of the positive results of tissue/organ regeneration as witnessed by several investigators using BM-derived cells (25, 26, 37, 62). On the other hand, when highly purified HSC were employed for regeneration experiments non-hematopoietic stem cells were likely excluded from these cell preparations. Thus in the current state of knowledge, the phenomenon of trans-differentiation of HSC and their contribution to regeneration of damaged tissues remains questionable.

Bone marrow as a source of non-hematopoietic stem cells for regeneration.

The “positive” data supporting stem cell plasticity can be re-interpreted by the assumption that BM-derived stem cells are heterogeneous and that BM tissue contains different types of stem cells including perhaps a rare population of pluripotent stem cells (PSC) (Figure 1).

The question remains, however, whether these PSC can continuously contribute in adult life to the renewal of other stem cells, including the most numerous population of stem cells in BM, HSC. There are several answers to this provocative, but timely, question (Table 2), especially in view of the current widely performed clinical trails with BM-derived stem cells in cardiology and neurology.

First, there is the obvious problem of isolating a sufficient number of these primitive cells from the BM. The number of these cells among BM MNC is very low (e.g., VSELs represent 1 cell in 10^4 - 10^5 of BM MNC population) (8). Furthermore, there are some indications that these cells are enriched in the BM of young mammals and their number decreases with age. It is likely that these non-hematopoietic stem cells released from the BM, even if they are able to home to the areas of tissue/organ injury, play a role only in regeneration of minor tissue injuries. Heart

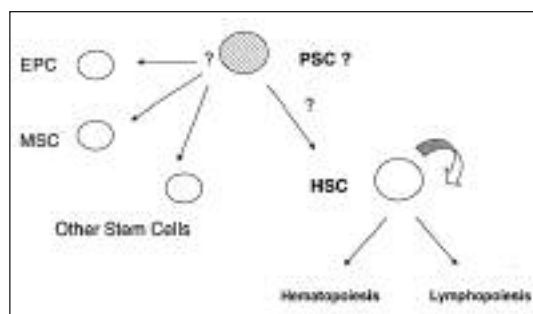


Fig. 1 - Versatile populations of stem cells in BM. BM is traditionally the home of self-renewing hematopoietic stem cells (HSC). BM also contains a small admixture of several non-hematopoietic stem cells such as i) endothelial progenitor cells (EPC), mesenchymal stem cells (MSC) and perhaps other tissue-committed stem cells (TCSC). The open question is whether BM contains pluripotent stem cells (PSC) and these cells are functional and able to supply all other types of stem cell in BM.

Tab. 2 - Pitfalls related to clinical application of BM-derived non-hematopoietic stem cells (e.g., VSELs)

-
- Isolation of a sufficient number of these cells from BM
 - Proper "repertoire" of homing signals in damaged organs
 - Adequate homing to damaged organs
 - Optimal delivery by systemic or local infusion
 - Effective contribution to organ/tissue regeneration
 - Lack of efficient ex vivo expansion of stem cells
-

infarct or stroke, on the other hand, would be considered to involve severe tissue damage beyond the capacity of these rare cells to effectively repair. Second, the allocation of these cells to the damaged areas depends on homing signals that may be inefficient in the presence of other cytokines or proteolytic enzymes released from leukocytes and macrophages associated with damaged tissue. For example, matrix metalloproteinases released from inflammatory cells degrade SDF-1 locally and thus perturb homing of CXCR4⁺ stem cells (63, 64). Third, it is not clear whether the optimal delivery system of these cells is intravenous infusion or direct injection into damaged tissues. Fourth, in order to reveal the full potential of these cells they have to be fully functional. We cannot exclude the possibility that these cells, while residing/being "trapped" in the BM, are not fully functional but remain "locked" in a dormant state and need the appropriate activation signals by unidentified factors. Finally, a major limitation is the lack of effective ex vivo expansion strategies for the most primitive stem cells. However, when such expansion protocols do become available, they should go a long way towards resolving the crucial problem of the low numbers of these cells available in the BM.

Humanity continually searches for the holy grail of an end to the suffering caused by illness, and a better quality of life in advancing years. There is no doubt that medical science is now looking to stem cells to provide some of milestones in this important quest. However, there is a crucial need for a reliable and non-controversial source of stem cells. Adult BM stem cells could potentially provide a real therapeutic alternative to the controversial use of human ES cells and therapeutic cloning. Hence, while the ethical debate on the application of ES cells in therapy continues, the potential of BM-derived non-hematopoietic stem cells is ripe for exploration. Researchers must determine whether these cells could be efficiently employed in the clinic or whether they are merely developmental remnants found in the BM that cannot be harnessed for regeneration. The coming years will bring important answers to these questions and researchers have already crossed the Rubicon.

References

1. Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967.
2. Shi Q., Rafii S., Wu MH., Wijelath ES., Yu C., Ishida A. et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; 92: 362-367.

3. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-74.
4. Peister A., Mellad JA., Larson BL., Hall BM., Gibson LF., Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 2004; 103: 1662-1668.
5. Jiang Y., Jahagirdar BN., Reinhardt RL., Schwartz RE., Keene CD., Ortiz-Gonzalez XR et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49.
6. D'Ippolito G., Diabira S., Howard GA. Menei P. Roos BA., Schiller PC. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 2004; 117: 2971-2981.
7. Kogler G., Sensken S., Airey JA., Trapp T., Muschen M., Feldhahn N. et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004; 200: 123-135.
8. Kucia M., Reza R., Campbell FR. Zuba-Surma E., Majka M., Ratajczak J. et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)/SSEA-1(+)/Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006; 20: 857-869.
9. Johnson J., Bagley J., Skaznik-Wikiel M., Lee HJ., Adams GB., Niikura Y. et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 2005; 122: 303-315.
10. Nayernia K., Lee JH. Drusenheimer N., Nolte J., Wulf G., Dressel R. et al. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab Invest* 2006; 86: 654-663.
11. Nagasawa T. A chemokine, SDF-1/PBSF, and its receptor, CXCR4 chemokine receptor 4, as mediators of hematopoiesis. *Int J Hematol* 2000; 72: 408-411.
12. Ma Q., Jones D., Borghesani PR., Segal RA., Nagasawa T., Kishimoto T. et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 9448-9453.
13. Taichman R., Reilly M., Verma R., Ehrenman K., Emerson S. Hepatocyte growth factor is secreted by osteoblasts and cooperatively permits the survival of haematopoietic progenitors. *Br J Haematol* 2001; 112: 438-448.
14. Kmiecik TE., Keller JR., Rosen E., Vande Woude GF. Hepatocyte growth factor is a synergistic factor for the growth of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1992; 80: 2454-2457.
15. Gomperts BN., Belperio JA., Rao PN., Randell SH., Fishbein MC., Burdick MD. et al. Circulating progenitor epithelial cells traffic via CXCR4/CXCL12 in response to airway injury. *J Immunol* 2006; 176: 1916-1927.
16. Long MA., Corbel SY., Rossi FM. Circulating myogenic progenitors and muscle repair. *Semin Cell Dev Biol* 2005; 16: 632-640.
17. Abbott JD., Huang Y., Liu D., Hickey R., Krause DS, Giordano FJ. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the

- heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* 2004; 110: 3300-3305.
18. Wojakowski W., Tendera M., Michalowska A., Majka M. Kucia M. Maslankiewicz K. et al. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004; 110: 3213-3220.
 19. Kucia M., Dawn B.m Hunt G., Guo Y., Wysoczynski M., Majka M. et al. Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. *Circ Res* 2004; 95: 1191-1199.
 20. Kucia M., Zhang YP., Reza R., Wysoczynski M., Machalinski B., Majka M. et al. Cells enriched in markers of neural tissue-committed stem cells reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood following stroke. *Leukemia* 2006; 20: 18-28.
 21. Kollet O., Shivtiel S., Chen YQ., Suriawinata J. Thung SN. Dabeva MD. et al. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 2003; 112: 160-169.
 22. Kale S., Karihaloo A., Clark PR., Kashgarian M., Krause DS., Cantley LG. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest* 2003; 112: 42-49.
 23. La Barge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 2002; 111: 589-601.
 24. Jackson KA., Majka SM., Wang H., Pocius J., Hartley CJ., Majesky MW. et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; 107: 1395-1402.
 25. Makino S., Fukuda K., Miyoshi S., Konishi F., Kodama H., Pan J. et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103: 697-705.
 26. Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., Reitsma M., Dohse M., Osborne L. et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234.
 27. Hess D., Li L., Martin M., Sakano S., Hill D., Strutt B. et al. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 763-770.
 28. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson SM., Li B. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705.
 29. Pesce M., Orlandi A., Iachininoto MG., Straino S., Torella AR., Rizzuti V. et al. Myoendothelial differentiation of human umbilical cord blood-derived stem cells in ischemic limb tissues. *Circ Res* 2003; 93: e51-62.
 30. Di Campli C., Piscaglia AC., Pierelli L., Rutella S., Bonanno G., Alison MR. et al. A human umbilical cord stem cell rescue therapy in a murine model of toxic liver injury. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 603-613.

31. Buzanska L., Machaj EK., Zablocka B., Pojda Z., Domanska-Janik K. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *J Cell Sci* 2002; 115: 2131-2138.
32. Corbel SY., Lee A., Yi L., Duenas J., Brazelton TR., Blau HM. et al. Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nat Med* 2003; 9: 1528-1532.
33. Mezey E., Chandross KJ., Harta G., Maki RA. McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000; 290: 1779-1782.
34. Corti S., Strazzer S., Del Bo R., Salani S., Bossolasco P., Fortunato F. et al. A subpopulation of murine bone marrow cells fully differentiates along the myogenic pathway and participates in muscle repair in the mdx dystrophic mouse. *Exp Cell Res* 2002; 277: 74-85.
35. Hess DC., Abe T., Hill WD., Studdard AM., Carothers J., Masuya M. et al. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp Neurol* 2004; 186: 134-144.
36. Corti S., Locatelli F., Donadoni C., Strazzer S., Salani S., Del Bo R. et al. Neuroectodermal and microglial differentiation of bone marrow cells in the mouse spinal cord and sensory ganglia. *J Neurosci Res* 2002; 70: 721-733.
37. Petersen BE., Bowen WC., Patrene KD., Mars WM., Sullivan AK., Murase N. et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170.
38. McKinney-Freeman SL., Jackson KA., Camargo FD., Ferrari G., Mavilio F., Goodell MA. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 1341-1346.
39. Orkin SH., Zon LI. Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat Immunol* 2002; 3: 323-328.
40. Wagers AJ., Sherwood RI., Christensen JL., Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; 297: 2256-2259.
41. Murry CE., Soonpaa MH., Reinecke H., Nakajima H., Nakajima HO., Rubart M. et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; 428: 664-668.
42. Castro RF., Jackson KA., Goodell MA., Robertson CS. Liu H., Shine HD. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. *Science* 2002; 297: 1299.
43. Morshead CM., Benveniste P., Iscove NN., van der Kooy D. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nat Med* 2002; 8: 268-273.
44. Pomerantz J., Blau HM. Nuclear reprogramming: a key to stem cell function in regenerative medicine. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 810-816.
45. Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz DM., Nakano Y. et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416: 542-545.
46. Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo JM., Fike JR., Lee HO.,

- Pfeffer K. et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003; 425: 968-973.
47. Nygren JM., Jovinge S., Breitbart M., Sawen P., Roll W., Hescheler J. et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004; 10: 494-501.
 48. Ying QL., Nichols J., Evans EP., Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; 416: 545-548.
 49. Vassilopoulos G., Wang PR., Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422: 901-904.
 50. Brittan M., Braun KM., Reynolds LE., Conti FJ., Reynolds AR., Poulsom R. et al. Bone marrow cells engraft within the epidermis and proliferate in vivo with no evidence of cell fusion. *J Pathol* 2005; 205: 1-13.
 51. Harris RG., Herzog EL., Bruscia EM., Grove JE., Van Arnem JS., Krause DS. Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science* 2004; 305: 90-93.
 52. Wurmser AE., Nakashima K., Summers RG., Toni N. D'Amour KA., Lie DC. et al. Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* 2004; 430: 350-356.
 53. Rafii S., Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003; 9: 702-712.
 54. Ratajczak J., Wysoczynski M., Hayek F., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* 2006; 20: 1487-1495.
 55. Ratajczak J., Miekus K., Kucia M., Zhang J., Reca R. Dvorak P. et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006; 20: 847-856.
 56. Beaudoin AR., Grondin G. Shedding of vesicular material from the cell surface of eukaryotic cells: different cellular phenomena. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1071: 203-219.
 57. Morel O., Toti F., Hugel B., Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol* 2004; 11: 156-164.
 58. Hugel B., Martinez MC., Kunzelmann C., Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20: 22-27.
 59. VanWijk MJ., VanBavel E., Sturk A., Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 277-287.
 60. Ratajczak MZ., Kucia M., Reca R., Majka M. Janowska-Wieczorek A. Ratajczak J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia* 2004; 18: 29-40.
 61. Kucia M., Reca R., Jala VR., Dawn B., Ratajczak J., Ratajczak MZ. Bone marrow as a home of heterogeneous populations of nonhematopoietic stem cells. *Leukemia* 2005; 19: 1118-1127.

62. Kucia M., Ratajczak J., Ratajczak MZ. Are bone marrow stem cells plastic or heterogenous-that is the question. *Exp Hematol* 2005; 33: 613-623.
63. Christopherson KW, 2nd, Hango G, Mantel CR, Broxmeyer HE: Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. *Science* 2004; 305: 1000-1003.
64. Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C, Rigal S, Jasmin C, Bourin P. et al. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood* 2000; 95: 756-768.

Cellule staminali mesenchimali e cellule progenitrici adulte multipotenti

Carlo Bernasconi

Già Professore Ordinario di Ematologia, Università di Pavia.

Consulente ematologo e coordinatore della ricerca sulle cellule staminali, IRCCS Fondazione “Salvatore Maugeri”, Pavia

Le nostre conoscenze sulla biologia e sulle particolari proprietà funzionali delle cellule staminali mesenchimali sono straordinariamente aumentate negli ultimi anni, ed è probabile un loro grande impatto sulla pratica clinica in un futuro non lontano. Appare quindi opportuno un aggiornamento sulle nuove acquisizioni.

Queste cellule, indicate nella letteratura internazionale con l'acronimo MSC (che designa sia la dizione usuale *mesenchymal stem cell*, sia la più recente dizione *mesenchymal stromal cell*), da tempo sono note come un supporto indispensabile per la normale ematopoiesi (Dexter et al., 1984). In seguito è stato accertato che si possono differenziare lungo le linee mesenchimali (adipociti, osteoblasti e condrociti) (Pittenger et al., 1999) e esibire anche in vario grado caratteristiche neurali (Sanchez-Ramos et al., 2000), epatiche (Weng et al., 2003) e cardiache (Toma et al., 2002), suggerendo un possibile ruolo nella riparazione tessutale. Più recentemente è stato accertato che le MSCs possiedono particolari proprietà immunomodulatorie (Keating, 2006), con implicazioni per il trapianto allogenico di cellule ematopoietiche e per il trattamento della GVDH (*graft versus host disease*).

Le MSCs sono state ottenute, nell'uomo e nel topo, soprattutto dal midollo osseo. Cellule con caratteristiche simili sono state però ottenute anche in specie differenti e da varie sorgenti, quali il grasso, il cuoio capelluto, il cordone ombelicale, la placenta, differenti tessuti fetali.

Definizione delle MSCs

La mancanza di un preciso criterio per la definizione di questa popolazione cellulare e una certa confusione di terminologia hanno rappresentato un ostacolo in questo campo di ricerca. Per tale motivo la *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) ha emanato una normativa per chiarire la nomenclatura delle MSCs, raccomandando a tutti i ricercatori di adottare in futuro questa uniforme terminologia (Horwitz et al., 2005).

In passato, le cellule aderenti alla plastica isolate *in vitro* dal midollo o da altre sorgenti sono state usualmente indicate come cellule staminali mesenchimali (MSC). Tuttavia, non tutte le cellule così isolate presentano i criteri generalmente accettati per un'attività di cellula staminale, rendendo il termine scientificamente inappropriato e potenzialmente frainteso. Per correggere questa discrepanza fra nomenclatura e proprietà biologiche, e chiarire la terminologia, il gruppo dei ricercatori dell'ISCT ha suggerito che le cellule aderenti alla plastica, simili ai fibroblasti, vengano indicate col termine di cellule multipotenti mesenchimali stromali (*mesenchymal stromal cells*), mentre il termine di cellule staminali mesenchimali (*mesenchymal stem cells*) deve venir usato solo per le cellule che possiedono le caratteristiche proprie delle cellule staminali. L'acronimo MSC, ampiamente utilizzato, può essere impiegato per indicare entrambe le popolazioni cellulari, come avviene nella pratica corrente. Nelle pubblicazioni scientifiche i ricercatori debbono chiaramente precisare la designazione scientificamente più corretta. Inoltre, nella terminologia dovrebbe essere inclusa anche l'indicazione della sorgente delle MSCs (*bone marrow-derived MSCs, fat-derived MSCs, etc.*). Il gruppo dell'ISCT ha anche fornito i criteri minimi per definire le MSCs. Tali criteri sono:

- 1) aderenza alla plastica in condizioni colturali standard;
- 2) espressione di CD105, CD73, CD90 e mancanza di espressione di CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 o CD19, LA-DR;
- 3) differenziazione *in vitro* in osteoblasti, adipociti e condroblasti.

Differenziazione e plasticità delle MSCs

Le MSCs derivate da midollo osseo umano possono essere mantenute *in vitro* in uno stato indifferenziato, ma con la capacità di produrre uno stroma funzionale di supporto all'ematopoiesi, oppure di differenziare lungo linee osteogeniche, condrogeniche o adipogeniche, quando poste in appropriati ambienti *in vitro* o *in vivo*. È stato dimostrato che nelle colture sono presenti MSC multipotenti e una miscela di progenitori commissionati, ciascuno con variabile potenziale differenziativo e capacità proliferativa. Una determinata popolazione di MSC in genere è formata, nelle migliori condizioni sperimentali, da poche cellule multipotenti e in gran parte da cellule bi- o uni-potenti (Digirolamo et al., 1999).

Si è sempre ritenuto che il commissionamento e la differenziazione verso le varie linee cellulari fosse un percorso non reversibile, bensì un processo *multi-step* unidirezionale con produzione terminale di cellule mature. Tuttavia, molti studi hanno dimostrato che differenti tessuti mesenchimali possono differenziare in coltura e poi essere indotti a cambiare fenotipo, e che eventi analoghi possono accadere *in vivo*. Esempi di questo fenomeno sono forniti da cellule osteogeniche formate da cellule con fenotipo condrogenico, e uno *switch* in coltura dalla linea adipocitica alla osteoblastica. È interessante sottolineare che questa plasticità delle MSC consente loro di cambiare il *pattern* di sviluppo sotto specifiche condizioni, e di adattarsi ai differenti tessuti che vanno ad occupare durante la crescita corporea (Bianco et al., 2001).

La comprensione dei meccanismi molecolari e cellulari che regolano la differenziazione delle MSCs verso determinati percorsi cellulari è favorita dalla scoperta di specifiche condizioni culturali *in vitro*. Ad esempio, lo stroma funzionale con capacità di sostegno all'ematopoiesi è prodotto in terreni di coltura contenenti anche il 10% di siero fetale di vitello, il 10% di siero di cavallo, idrocortisone, L-glutamina; la differenziazione osteogenica è stimolata dalla presenza di β -glicerofosfato, acido ascorbico 2-fosfato, desametasone, FBS; la differenziazione condrogenica avviene in un terreno senza siero e addizionato con TGF- β ; la differenziazione adipogenica è stimolata dall'isobutilmetilzantina, dall'indometacina e dall'idrocortisone. Tutte queste sostanze attivano specifici percorsi, che portano alle diverse differenziazioni (Kemp et al., 2005).

È necessario inoltre sottolineare che studi *in vitro* hanno dimostrato altri percorsi differenziativi per le MSCs, in particolare verso gli endoteli, il muscolo, il tessuto nervoso. A sostegno dell'ipotesi che linee non-mesenchimali possano essere generate da cellule progenitrici mesenchimali sono stati utilizzati criteri morfologici, fenotipici e di espressione genica (Wakitani et al., 1995; Zhao et al., 2002; Woodbury et al., 2002). Dall'insieme di parecchi studi appare oggi evidente che le MSCs possiedono una notevole malleabilità e una plasticità di grado elevato. Tali caratteristiche fanno di queste cellule una risorsa particolarmente interessante per molteplici applicazioni cliniche.

Proprietà immunologiche delle MSCs

Dati recenti, la maggior parte ottenuti con ricerche *in vitro*, dimostrano che le MSCs possono sfuggire al riconoscimento immunologico e inibire la risposta immunitaria. Entrambe queste proprietà hanno importanti applicazioni per i trapianti cellulari.

Bassa immunogenicità

Parecchi studi hanno indicato che le MSCs non provocano una risposta proliferativa da linfociti alloreattivi (Bartholomew et al., 2002; Le Blanc et al., 2003; Maitra et al., 2004). I meccanismi di questo fenomeno non sono completamente noti, ma possono essere correlati ai livelli di espressione degli antigeni di classe II del maggior sistema di istocompatibilità (MHC) e delle molecole costimolatorie, e anche alla capacità delle MSCs di inibire la reazione immune.

Le MSC esprimono le molecole MHC di classe I, bassi livelli di molecole MHC di classe II e costimolatorie B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD40 o CD40 1. Questo fenotipo è considerato come non-immunogenico (Le Blanc et al., 2003).

Un quesito di notevole importanza clinica riguarda il mantenimento *in vivo* di questa condizione immuno-privilegiata delle MSCs, che conferirebbe loro la caratteristica di sorgente allogenica per terapie cellulari. I risultati di recenti studi condotti nel topo da Eliopoulos et al. (2005) depongono però contro questo stato immuno-privilegiato delle MSCs, e contrastano la nozione che queste cellule possano servire da "donatore universale". Considerando l'importanza delle implicazioni cliniche, sono senz'altro necessari ulteriori studi sperimenta-

li *in vivo* per chiarire definitivamente il possibile *engraftment* delle MSCs attraverso la barriera MHC. È possibile che un'eterogeneità funzionale immunologica fra MSCs, e differenze di specie, intervengano a spiegare le disparità fra i dati pubblicati.

Inibizione della alloimmunizzazione.

Parecchi dati indicano che le MSCs sono immunosoppressive *in vitro* e inibiscono la proliferazione linfocitaria da alloantigeni in colture linfocitarie miste (MLC) ed a mitogeni non specifici. Il grado della immunosoppressione è dipendente dalla concentrazione di MSCs in coltura, ed a basse concentrazioni è di tipo stimolatorio piuttosto che inibitorio (Le Blanc et al., 2003). La soppressione dell'alloreattività è stata osservata anche quando MSCs umane vengono aggiunte a MLCs in corso, con o senza preincubazione con IFN γ , senza restrizioni genetiche (Klyushnenkova et al., 2005).

Le MSCs sopprimono la proliferazione linfocitaria anche in colture nelle quali le MSCs stesse vengono separate dai linfociti *responders* mediante una membrana semipermeabile, indicando che la soppressione è mediata da fattori solubili (Klyushnenkova et al., 2005). Sono state coinvolte parecchie molecole, ed è emersa una storia piuttosto complicata. Uno studio che mostrava come anticorpi neutralizzanti il TGF- β (*transforming growth factor*- β) e l'HGF (*hepatocyte growth factor*) togliessero la soppressione (Di Nicola et al., 2002), non è stato confermato da Le Blanc et al. (2004). Questi Autori hanno trovato che anticorpi diretti contro lo SDF-1, l'osteoprotegerina, l'HGF e il TGF- β , soli o in combinazione, non tolgono la soppressione.

La prostaglandina-E2 è apparsa la molecola più promettente. L'inibizione della sintesi di prostaglandina-E2 mediante indometacina ha dimostrato di recuperare l'alloreattività mitogeni-attivata, ma non ha influenzato la soppressione dell'alloreattività in MLCs. Il gruppo di Le Blanc ha proseguito dimostrando che sono implicate IL-2 e IL-10, e ha concluso che i meccanismi di soppressione immunologica indotti dalle MSCs possono dipendere dai tipi di stimoli T-cellulari (Rasmusson et al., 2005).

Prospettive di applicazione clinica della immunomodulazione mediata dalle MSCs

Le complesse proprietà immuno-correlate delle MSCs (bassa immunogenicità e soppressione dell'alloreattività) suggeriscono che queste cellule possono essere utili nel trattamento della GVHD.

In modelli murini i dati raccolti sono controversi. In uno studio condotto cotrapiantando MSCs del donatore in ricevente *MHC-mismatched* è stata osservata una prevenzione della GVHD (Chung et al., 2006), mentre in un altro studio non è stato trovato alcun effetto a favore di una soppressione dell'alloreattività esercitato dalle MSCs (Sudres et al., 2006).

L'argomento potrebbe essere risolto da studi clinici attualmente in corso. Suggestivo al riguardo può essere un caso segnalato da Lee et al. (2004) di un paziente sottoposto ad un trapianto alloidentico con sangue periferico e MSCs

senza GVHD acuta. Successivamente, Lazarus et al. (2005) hanno dimostrato la fattibilità e sicurezza del cotrapianto di MSCs e cellule staminali ematopoietiche da fratelli HLA identici in 46 pazienti con neoplasie ematologiche. Particolarmente interessante è il caso recentemente segnalato da Le Blanc et al. (2004). Si tratta di un bambino di 9 anni, con GVHD acuta di grado IV con interessamento epatico e intestinale, trattato con due infusioni di MSCs aploidentiche di un terzo *partner*, la madre del paziente. Cellule epiteliali femminili sono state ritrovate in una successiva biopsia normale del colon. Le MSCs della madre avevano soppresso *in vitro* i linfociti del paziente, prima e dopo l'infusione delle MSCs. Visto il successo di questo caso, oggi ben noto, sono attesi con grande interesse i risultati di più ampi studi prospettici di profilassi e trattamento della GVHD acuta con MSCs (Keating, 2006).

Cellule progenitrici adulte multipotenti

Una popolazione di cellule dotate di elevata plasticità, derivate da midollo osseo adulto e indicate come *multipotent adult progenitor cells* (MAPCs), possono essere ottenute *in vitro* da midollo posnatale (e da altri organi) di topo, ratto e uomo (Jiang et al., 2002). Queste cellule vengono purificate inizialmente con le MSCs e crescono *in vitro* come cellule aderenti. Tuttavia, a differenza dalle MSCs, le MAPCs possono essere coltivate indefinitamente in un mezzo nutritivo relativamente povero. Cambiamenti specifici nei fattori di crescita inducono una differenziazione delle MAPCs in cellule che portano marcatori endodermici, mesodermici o ectodermici.

Cellule con caratteristiche simili sono state successivamente descritte in letteratura, come le *marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells* (D'Ippolito et al., 2004), le *very small embryonic-like (VSEL) stem cells* (Kucia et al., 2006), e altre cellule. È probabile che in molti casi si tratti di sovrapposizioni di popolazioni cellulari multipotenti simili, evidenziate e studiate con metodiche diverse e quindi indicate con differente terminologia.

Di particolare interesse è il quesito se le MAPCs mantengano *in vivo* il loro ampio potenziale differenziativo. In un modello sperimentale è stato dimostrato che dopo somministrazione endovenosa nel topo immunodeficiente irradiato a dosi subletali, le MAPCs differenziano a vari gradi in cellule ematopoietiche nel midollo, milza e sangue, e in cellule epiteliali nel fegato, intestino e polmone (Herzog et al., 2003). Inoltre, in accordo con la loro capacità a crescere indefinitamente *in vitro* ed a autorinnovarsi *in vivo*, sta il fatto che le MAPCs esprimono la telomerasi, e che la lunghezza dei telomeri si mantiene immodificata dopo molte divisioni cellulari.

Non è sino ad ora stato chiarito se le MAPCs siano una distinta e rara sottopopolazione delle MSCs, normalmente presente nell'uomo, o se il loro potenziale *in vivo* sia un fenomeno sviluppato sotto le particolari condizioni colturali *in vitro*. Sono in corso tentativi per isolare MAPCs non in coltura. Comunque, la scoperta di queste cellule dotate di ampia plasticità apre promettenti nuove strade alla ricerca.

Bibliografia

1. Dexter TM., Sponcer E., Schofield E., et al. Hematopoietic stem cells and the problem of self-renewal. *Blood Cells*, 10, 315, 1984.
2. Pittenger MF., Mackay AM., Beck SC., et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143, 1999.
3. Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F., et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol.*, 164, 247, 2000.
4. Weng YS., Lin HY., Hsiang YJ., et al. The effects of different growth factors on human bone marrow stromal cells differentiating into hepatocyte-like cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 534, 119, 2003.
5. Toma C., Pittenger MF., Cahill KS., et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 105, 93, 2002.
6. Keating A. Mesenchymal stromal cells. *Curr. Opin. Hematol.*, 13, 419, 2006.
7. Horwitz EM., Le Blanc K., Dominici M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7, 393, 2005.
8. Digirolamo CM., Stokes D., Colter D., et al. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br.J. Haematol.*, 107, 275, 1999.
9. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 19, 180, 2001.
10. Kemp KC., Hows J., Dolaldson C. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Leuk. Lymph.*, 46, 1531, 2005.
11. Wakitani S., Saito T., Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, 18, 1417, 1995.
12. Zhao LR., Duan WM., Reyes M., et al. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp. Neurol.*, 174, 11, 2002.
13. Woodbury D., Reynolds K., Black IB. Adult bone marrow stromal cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J. Neurosc. Res.*, 69, 908, 2002.
14. Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M. et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol.*, 30, 42, 2002.
15. Le Blanc K., Tammik C., Rosendahl K. et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.*, 31, 890, 2003.
16. Le Blanc K., Rasmuson I., Gotherstrom C. et al. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukine-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand. J. Immunol.*, 60, 307, 2004.

17. Maitra B., Szekely E., Gjini K. et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant.*, 33, 597, 2004.
18. Klyushnenkova E., Mosca J.D., Zernetkina V. et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells : immunogenicity, tolerance, and suppression. *J. Biochem Sc.* 12, 47, 2005.
19. Eliopoulos N., Stagg J., Lejeune L. et al. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood*, 106, 4057, 2005.
20. Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M. et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or non-specific mitogenic stimuli. *Blood*, 99, 3838, 2002.
21. Rasmuson I., Ringden O., Sundberg B. et al. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp. Cell Res.* 305, 33, 2005.
22. Chung NG., Jeong DC., Park SJ. et al. Cotransplantation of marrow stromal cells may prevent lethal graft-versus-host disease in major histocompatibility complex mismatched murine hematopoietic stem cell transplantation. *Int. J. Hematol.*, 80, 370, 2006.
23. Sudres M., Norol F., Trenado A. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J. Immunol.*, 176, 7761, 2006.
24. Lazarus H., Koc O., Devine S. et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol. Blood Marrow Transplant*, 11, 389, 2005.
25. Lee ST., Jiang JH., Cheong JW. et al. Treatment of high-risk acute myelogenous leukaemia by myeloablative chemoradiotherapy followed by coinfusion of T-cell-depleted haematopoietic stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells from a related donor with only fully mismatched human leukocyte antigen aplotype. *Br. J. Haematol.*, 118, 1128, 2004.
26. Le Blanc K., Rasmuson I., Sundberg B. et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third arty haploidentical mesenchymalstem cells. *Lancet*, 363, 1439, 2004.
27. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418, 41, 2002.
28. D'Ippolito G., Diabira S., Howard GA. et al. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J. Cell Sc.* 117, 2971, 2004.
28. Kucia M., Reza R., Campbell FR. et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)/SSEA-1(+)/Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia*, 20, 857, 2006.
30. Herzog EL., Chai L., Krause DS. et al. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, 102, 3483, 2003.

TRAPIANTO DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE: PROBLEMI APERTI

Come migliorare i risultati del trapianto autologo: l'esempio dei linfomi maligni

*Corrado Tarella, Manuela Zanni, Alberto Rocci, Marco Ruella,
Angela Gueli, Irene Ricca*

Dip Medicina-Oncologia Sperimentale, Divisione Universitaria di Ematologia,
Università degli Studi e A.S.O. S. Giovanni B. di Torino

Autotrapianto e progenitori emopoietici circolanti

Dall'inizio degli anni '80 il trapianto di midollo autologo si è progressivamente imposto come un trattamento efficace in molte patologie emopoietiche, in particolare nei linfomi (1-4). Infatti, l'impiego di chemioterapia intensificata consente spesso di ottenere risultati, in termini di remissione di malattia e di sopravvivenza complessiva, non raggiungibili con la chemioterapia a dosi convenzionali. L'efficacia del trapianto autologo è aumentata in questi ultimi anni, grazie ai perfezionamenti delle metodiche che hanno comportato una drastica riduzione della tossicità correlata al trattamento. Inizialmente, l'approccio trapiantologico è stato limitato dalla elevata mortalità, secondaria alle complicanze indotte dalla prolungata citopenia dopo reinfusione di materiale midollare. L'incidenza di complicanze mortali, con il trapianto di midollo, si aggirava tra il 5 e 10%, con alcune punte sino al 15-20%, nelle casistiche di pazienti più ad alto rischio (1). Questa grave problematica è stata notevolmente ridimensionata dall'introduzione della metodica basata sull'uso dei progenitori e cellule staminali circolanti (PBPC). I primi studi, condotti tra la fine degli anni '80 ed i primi anni '90, hanno mostrato che le PBPC, rilasciate nel sangue periferico dopo chemioterapia e fattore di crescita (G-CSF o GM-CSF), se reinfuse durante l'autotrapianto, comportavano ripresa emopoietica molto più rapida rispetto all'approccio classico con cellule midollari (5). Numerosi successivi studi hanno confermato le iniziali osservazioni e le PBPC sono le cellule usualmente impiegate per le procedure trapiantologiche, sia di auto che, ora, anche di allo-trapianto (6, 7).

Il vantaggio della rapida ricostituzione ematologica dopo trapianto di PBPC si traduce in una netta riduzione dei rischi infettivi ed emorragici e in definitiva in un calo della mortalità peritrapiantologica, con un'incidenza massima intorno all'1-2%, nelle casistiche di pazienti più ad alto rischio. L'uso delle PBSC comporta, poi, ulteriori vantaggi, quali:

- 1) la ridotta richiesta di terapia trasfusionale, antibiotica e di supporto generale;
- 2) tempi di ricovero decisamente abbreviati
- 3) un drastico abbattimento del costo complessivo della procedura (6, 7).

Tutti questi motivi spiegano come, nell'ultimo decennio, la procedura dell'autotrapianto con cellule staminali periferiche ha avuto una rapida e progressiva diffusione e, sebbene si tratti sempre di un trattamento impegnativo, viene abitualmente considerato come trattamento adatto per pazienti di età fino ai 65 anni.

Autotrapianto di PBPC e linfomi: l'approccio HDS

Tra le varie neoplasie oncologiche, i linfomi sono forse la forse la patologia che più ha beneficiato di trattamenti intensivi con autotrapianto. Al momento l'autotrapianto con PBPC è considerato il trattamento di scelta nella terapia cosiddetta "di salvataggio", sia nel linfoma di Hodgkin che nei linfomi non Hodgkin, dopo fallimento con terapia convenzionale (2, 4, 8). Diversi studi hanno riportato anche un notevole vantaggio nell'utilizzo dell'autotrapianto in prima linea per diverse forme di linfoma, con presentazione clinica sfavorevole (9). Rispetto alla terapia convenzionale, il trapianto autologo in prima linea sembra offrire più alte percentuali di risposta al trattamento e migliori possibilità di sopravvivenza a lungo termine, almeno per i linfomi mantellari e alcuni altri sottotipi di linfoma, a presentazione clinica "ad alto rischio".

Nelle neoplasie chemio-sensibili, in particolare nei linfomi, l'efficacia dell'autotrapianto sembra essere tanto maggiore se preceduto da dosi intensificate di chemioterapia, nelle fasi antecedenti la procedura trapiantologia (8-10). La migliorata tollerabilità dell'autotrapianto con PBPC ha infatti consentito di sviluppare nuovi programmi terapeutici, basati sul concetto della intensificazione di dose chemioterapica, sin dalle prime fasi del trattamento. Un esempio tipico di tale approccio è lo schema noto come HDS (High Dose Sequential Chemotherapy), ideato anni fa dal gruppo del Prof. Gianni, dell'Istituto Nazionale Tumori di Milano, e poi sviluppato negli anni '90, da una lunga e stretta ricerca collaborativa tra il gruppo di Milano e il nostro gruppo di Torino (3, 5, 6-9). Lo schema HDS si basa sostanzialmente sulla somministrazione, ogni 15-20 giorni, di 2-4 cicli di chemioterapia ad alte dosi, seguiti dalla fase finale di autotrapianto. Le PBPC vengono mobilizzate e raccolte dopo i cicli ad alte dosi e riutilizzate per la fase finale dell'autotrapianto.

L'esperienza con approccio HDS nei Linfomi Follicolari

Lo schema HDS è stato variamente impiegato nel trattamento di linfomi, sia alla diagnosi che in recidiva. Una delle esperienze più importanti, è stata quella condotta con questo approccio intensivo nel trattamento dei linfomi follicolari (FL). Nell'ottica di adattare il programma HDS per il sottotipo FL, è stato messo a punto uno schema denominato i-HDS (intensified-High Dose Sequential), che contiene alcune sostanziali modifiche, che si possono riassumere nei seguenti punti:

- 1) prolungata citoriduzione iniziale;
- 2) raccolta delle PBPC posticipata al termine della fase ad alte dosi, con l'obiet-

tivo di esercitare un effetto di “in vivo purging”, indotto dalla prolungata chemioterapia;

- 3) fase finale mieloablattiva senza Total Body Irradiation, con l’obiettivo di ridurre i rischi di tossicità, in particolare i rischi di insorgenza di secondi tumori (10).

Gli studi iniziali con i-HDS furono soddisfacenti. In una serie di pazienti con FL trattati alla diagnosi, furono ottenute elevate percentuali di in remissione completa clinica e molecolare (11, 12). In seguito, abbiamo potuto aggiornare l’andamento dei pazienti dell’originale studio pilota ed abbiamo osservato con soddisfazione che, ad una proiezione di 14 anni, la curva di sopravvivenza senza segni di progressione di malattia si proietta al 60% (13). I pazienti lungo-sopravviventi, senza malattia presentano anche persistenza di remissione molecolare, ovvero di PCR negatività, ed è quindi logico presumere che, almeno una quota di questi pazienti, possa essere considerata guarita (13).

Sulla base di questa iniziale esperienza unicentrica, nel 1996 il Gruppo Italiano Trapianto di midollo Osseo (GITMO) ha ritenuto opportuno effettuare uno studio multicentrico che dimostrasse la riproducibilità dei dati osservati nello studio torinese. I risultati di questo studio, condotto su 93 pazienti, hanno sostanzialmente confermato i risultati dei precedenti studi, come dettagliato nel lavoro pubblicato nel 2003 su Blood (14). Innanzitutto, il programma multicentrico GITMO ha dimostrato una tossicità a breve e lungo termine sovrapponibile o inferiore ai precedenti studi pilota. In particolare, non si sono notate differenze in termini di fattibilità e tossicità tra i pazienti seguiti presso le Istituzioni di maggiori dimensioni rispetto a quelli trattati nei Centri minori. Anche l’efficacia in termini di ottenimento della CR, sopravvivenza globale e sopravvivenza libera da malattia è risultata sovrapponibile ai dati ottenuti nel precedente studio unicentrico con i-HDS. Un altro dato rilevante è stata la buona efficacia delle terapie di salvataggio. Gran parte dei pazienti che hanno presentato recidiva di malattia, hanno potuto essere efficacemente gestiti con programmi terapeutici differenti ed alcuni hanno perfino ottenuto una seconda RC, in genere grazie a terapie contenenti l’anticorpo monoclonale anti-CD20 Rituximab. Recentemente abbiamo aggiornato l’andamento a lungo termine dei pazienti entrati in questo studio e abbiamo così verificato che l’incidenza di mielodisplasie secondarie è contenuta, e la proiezione di sopravvivenza complessiva resta superiore al 75%, ad un follow-up mediano di 6 anni (15). La sopravvivenza è stata particolarmente soddisfacente nei pazienti a prognosi sfavorevole (aaPI 2-3), con proiezioni a 7 anni intorno all’80% (15). Tale risultato è senza dubbio molto buono, considerando le aspettative medie di 2-3 anni riportati storicamente per i pazienti con FCL ad alto rischio, trattati con chemioterapia convenzionale.

Autotrapianto e anticorpo monoclonale anti-CD20

Negli ultimi anni, la disponibilità dell’anticorpo monoclonale anti-CD20 Rituximab ha rappresentato una nuova importante opzione terapeutica per la cura dei linfomi a B cellule (16). Sebbene la sua efficacia sia stata ampiamente valu-

tata in associazione con regimi di chemioterapia convenzionale, il Rituximab ha consentito anche di migliorare i risultati dell'autotrapianto. In effetti, è stato logico pensare di integrare programmi di chemioterapia intensiva con l'anticorpo anti-CD20 Rituximab. In particolare, studi clinici e molecolari, condotti con lo schema HDS, hanno dimostrato l'elevata efficacia del Rituximab, nel purificare in vivo le raccolte di PBSC (17, 18). In questo ambito, il Rituximab viene utilizzato principalmente prima della raccolta delle PBSC, per cercare di operare una sorta di "purgino in vivo", ovvero per ridurre se non azzerare il rischio di raccogliere, insieme alle PBPC, cellule tumorali contaminanti, come dettagliato nella Figura 1. In realtà, i vantaggi teorici di questa combinazione sono numerosi ed includono: i. l'effetto di "in vivo purging" espletato dal Rituximab; ii. l'incremento dell'efficacia anti-tumorale basato sull'effetto pro-apoptotico del Rituximab; iii. la possibilità di trattare efficacemente eventuali popolazioni residue dopo l'autotrapianto. L'aggiunta del Rituximab sembra quindi aver significativamente aumentato l'efficacia terapeutica dei programmi di terapia intensiva con autotrapianto, nei pazienti con B-linfoma (9).

Recentemente, nell'ambito del gruppo multicentrico GITIL (Gruppo Italiano Terapie Innovative nei Linfomi) abbiamo condotto una valutazione retrospettiva su una ampia serie di oltre 900 pazienti con linfomi a B cellule, trattati con approccio HDS (19). I pazienti sono stati trattati con HDS per linfoma refrattario/recidivato o per malattia all'esordio, con presentazione a prognosi molto sfavorevole. Circa metà fu trattata con solo HDS l'altra metà ha ricevuto HDS potenziato con Rituximab. La maggior parte dei pazienti ha potuto completare il trattamento, con la fase finale dell'autotrapianto (86% nel gruppo HDS, 87% nel gruppo HDS+Rituximab). Valutando la sopravvivenza complessiva e la sopravvivenza senza eventi, abbiamo potuto verificare l'efficacia dell'aggiunta del Rituximab. Infatti, in tutti i sottogruppi analizzati, l'andamento è stato decisamente migliore tra i pazienti che hanno ricevuto l'HDS potenziato con anti-CD20 rispetto a quelli trattati con solo HDS. Pertanto, considerando anche l'ampia casistica esaminata, si può concludere che l'aggiunta del Rituximab rappresenta un sicuro miglioramento nell'efficacia non solo della chemioterapia convenzionale ma anche di approcci intensivi con autotrapianto, quale lo schema HDS.

Commenti conclusivi

Da tutto quanto sinora riportato, emerge come l'approccio con autotrapianto sia una risorsa terapeutica importante, in particolare nei linfomi; tale approccio terapeutico ha subito importanti modifiche negli ultimi 15 anni, che hanno reso più sicura e più efficace questo trattamento. I principali benefici che si sono resi disponibili, sono stati dapprima l'introduzione dell'uso delle PBPC e più recentemente l'aggiunta del Rituximab. Dal punto di vista terapeutico vi sono tuttora discussioni aperte sulle indicazioni all'impiego di terapie intensive con autotrapianto. L'approccio con autotrapianto è sicuramente da considerare per i pazienti con linfoma refrattario o recidivato così come per il trattamento all'esordio di alcune forme a prognosi sfavorevole, quali il linfoma mantellare o i linfomi follicolari e

diffusi a grandi cellule, con presentazione clinica “ad alto rischio”. In tutte queste forme, ove la chemioterapia convenzionale rimane ancora insoddisfacente, il trapianto ha rappresentato una valida alternativa, e negli ultimi anni, grazie anche alla possibilità di combinazione con l’anticorpo anti-CD20, ha offerto risultati decisamente promettenti. I prossimi anni vedranno lo sviluppo di numerose nuove risorse terapeutiche, tra le quali ricordiamo gli ulteriori nuovi anticorpi monoclonali, la radioimmunoterapia, l’immunoterapia attiva, gli oligonucleotidi anti-senso e gli approcci vaccinatorapici. È probabile che l’uso sia della chemioterapia convenzionale così come degli approcci intensificati con autotrapianto, potranno giovare di queste nuove terapie, consentendo di offrire ad un sempre maggior numero di pazienti con linfoma la possibilità di lunghe sopravvivenze senza malattia e possibilmente la guarigione completa della malattia.

Bibliografia

1. Armitage JO. Bone marrow transplantation in the treatment of patients with lymphoma. *Blood*. 1989 May 15; 73(7): 1749-58.
2. Philip T., Guglielmi C., Hagenbeek A., et al. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin’s lymphoma. *N Engl J Med*. 1995 Dec 7; 333(23): 1540-5.
3. Gianni AM., Bregni M., Siena S., et al. High-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation compared with MACOP-B in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 1997 May 1; 336(18): 1290-7.
4. Salles G., Coiffier B. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for non-Hodgkin’s lymphoma. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999; 12: 151-169.
5. Gianni AM., Siena S., Bregni M., et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation. *Lancet*. 1989 Sep 9; 2(8663): 580-5.
6. Tarella C., Gavarotti P., Caracciolo D., et al. Haematological support of high-dose sequential chemotherapy: clinical evidence for reduction of toxicity and high response rates in poor risk lymphomas. *Ann Oncol*. 1995; 6 Suppl 4: 3-8 *Review*.
7. Schmitz N., Linch DC, Dreger P., et al. Randomised trial of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma patients. *Lancet* 1996; 347: 353-57.
8. Tarella C., Cuttica A., Vitolo U., et al. High-Dose Sequential Chemotherapy And Peripheral Blood Progenitor Cell (PBPC) Autografting In Refractory/Relapsed Hodgkin’s Lymphoma: A Multicenter Study Of The Interggruppo Italiano Linfomi (Iil) Showing Prolonged Disease-Free Survival In Patients Treated At First Relapse. *Cancer*, 2003; 97: 2748-2759.
9. Tarella C., Gianni AM. Bone marrow transplantation for lymphoma CR1. *Curr Opin Oncol*. 2005; 17(2): 99-105 *Review*.

10. Tarella C., Zallio F., Caracciolo D., et al. Hemopoietic progenitor cell mobilization and harvest following an intensive chemotherapy debulking in indolent lymphoma patients. *Stem Cells* 1999, 17: 55-61.
11. Corradini P., Astolfi M., Cherasco C., et al. Molecular monitoring of minimal residual disease in follicular and mantle cell non-Hodgkin's lymphomas treated with high-dose chemotherapy and peripheral blood progenitor cell autografting. *Blood* 1997; 89: 724-31.
12. Tarella C., Caracciolo D., Corradini P., et al. Long-term follow-up of advanced-stage low-grade lymphoma patients treated upfront with high-dose sequential chemotherapy and autograft. *Leukemia*. 2000; 14(4): 740-7.
13. Corradini P., Ladetto M., Zallio F., et al. Long-Term Follow-Up Of Indolent Lymphoma Patients Treated With High-Dose Sequential Chemotherapy And Autografting: Evidence That Durable Molecular And Clinical Remission Can Be Frequently Attained Only In Follicular Subtypes. *J Clin Oncol*, 2004; 22(8): 1460-8.
14. Ladetto M., Corradini P., Vallet S., et al. High Rates Of Clinical And Molecular Remissions In Follicular Lymphoma Patients Receiving High-Dose Sequential Chemotherapy And Autografting At Diagnosis: A Multicenter, Prospective Study By The Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (Gitmo). *Blood* 2002; 100(5): 1559-65.
15. Ladetto M., Vallet S. Benedetti F., et al. Prolonged Survival And Low Incidence Of Late Toxic Sequelae In Advanced Follicular Lymphoma Treated With A Tbi-Free Autografting Program: Updated Results Of The Multicenter Consecutive Gitmo Trial. *Leukemia* 2006; 20: 1840-7.
16. Coiffier B. Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma: A Look over the Past Decade. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2006; 7 (Suppl 1): S7-S13.
17. Magni M., Di Nicola M., Devizzi L., et al. Successful in vivo purging of CD34-containing peripheral blood harvests in mantle cell and indolent lymphoma: evidence for a role of both chemotherapy and rituximab infusion. *Blood* 2000; 96(3): 864-9.
18. Ladetto M., Zallio F., Vallet S., et al. Concurrent administration of high-dose chemotherapy and rituximab is a feasible and effective chemo/immunotherapy for patients with high-risk non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*. 2001; 15(12): 1941-9.
19. Tarella C., Zanni M., Magni M., et al. Benefit of Rituximab Addition to High-Dose Programs with Autograft for B-Cell Lymphoma: A Multicenter GITIL Survey on 957 Patients - American Society of Hematology Congress 2006 - Orlando, Abs # 207.

Trapianto allogenico e controllo della GvHD

Franco Aversa

Centro Trapianti Midollo Osseo, Sezione di Ematologia e Immunologia Clinica,
Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Perugia

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche (CSE), sia prelevate dal midollo osseo che raccolte nel sangue periferico dopo mobilizzazione con fattori di crescita emopoietici, si è imposto, a partire dagli anni 70, quale migliore terapia post-remissionale delle leucemie acute ad alto rischio di recidiva e per la cura di altre numerose malattie ematologiche quali leucemia mieloide cronica, disordini linfoproliferativi cronici, anemia aplastica, emoglobinopatie, immunodeficienze e disordini congeniti del metabolismo.

Il regime di condizionamento al trapianto e l'effetto allogenico del trapianto, la cosiddetta *graft-versus-leukemia* (GvL), rappresentano i due meccanismi attraverso i quali il trapianto è in grado di curare la malattia di base (1). Il regime di condizionamento contribuisce, attraverso il suo effetto immunosoppressivo e mieloablativo, all'attecchimento delle cellule emopoietiche e alla iniziale eradicazione della malattia per la quale è stata posta l'indicazione trapiantologica. La stabilità dell'attecchimento e la definitiva cura della malattia sono poi affidate alla capacità del sistema immunologico del donatore di riconoscere e distruggere nel ricevente, attraverso effettori cellulari linfocitari, sia il tessuto emopoietico normale che la malattia minima residua sopravvissuta al trattamento pre-trapianto. Questo effetto GvL è mediato da linfociti T del donatore alloreattivi verso gli antigeni MHC del ricevente a distribuzione tissutale molto ampia e quindi è strettamente collegato con la stessa GvHD.

È evidente come nel trapianto di CSE si realizzi una competizione tra fattori ematopoietici (cellule staminali ematopoietiche) e immunologici (sistema T linfoide) del donatore con fattori ematopoietici (cellule staminali normali e cellule staminali leucemiche) e immunologici (CTLp: precursori linfocitari T citotossici) del ricevente (2). Variazioni nella composizione dell'inoculo richiedono in genere altrettanti cambiamenti nella preparazione del paziente e nei trattamenti post-trapianto. Una conferma della stretta correlazione tra condizionamento e trapianto è stata fornita dall'esperienza maturata, a partire dagli inizi degli anni 1980, con la T-deplezione, introdotta nella pratica clinica per prevenire la GvHD (3).

L'eliminazione *ex vivo* dei T-linfociti del donatore dall'inoculo, che rimane ancora oggi nonostante il vasto armamentario di immunosoppressori disponibili in commercio la migliore profilassi della GvHD, ha messo in chiara evidenza il ruolo del regime di condizionamento al trapianto. In effetti, una volta eliminati i T linfociti dall'inoculo, si crea una condizione di svantaggio tra donatore e ricevente a causa della persistenza nel ricevente, sottoposto ad un regime di condizionamento standard, di un sistema immunologico ancora in grado di rigettare le cellule emopoietiche del donatore. Condizionamenti convenzionali, quali Total body irradiation+Ciclofosfamide (TBI/CY) o Busulfano+Ciclofosfamide (BU/CY), non garantiscono una eradicazione del sistema immune del ricevente né della malattia leucemica residua. Ne consegue che l'infusione di cellule ematopoietiche sottoposte ad una profonda T-deplezione deve avvenire solo dopo aver compensato il potere immunosoppressivo e mieloablativo del regime di condizionamento. Il nostro gruppo, già nel 1985, ha modificato il regime di condizionamento del Memorial Sloan Kettering Cancer Center di New York aumentando la dose della TBI frazionata da 13.2 a 14.4 Gy e aggiungendo l'ATG alla CY (4). Inoltre, partendo da dati ottenuti in modelli murini di trapianto T depletato in cui emergeva il ruolo di farmaci ad elevato potere mieloablativo quali BU dime-tilmyleran (DMM) o thiotepa (TT) nella prevenzione del rigetto (5, 6), nel 1987, il nostro regime di condizionamento standard (TBI-CY-ATG) è stato ulteriormente modificato con l'aggiunta del thiotepa con lo scopo di potenziare, attraverso il suo effetto mieloablativo, sia l'attecchimento che l'eradicazione della malattia leucemica residua (7).

I risultati in 54 pazienti con leucemia acuta, sottoposti a trapianto di midollo osseo depletato in T linfociti mediante agglutinazione con lectina soybean agglutinin ed E-rosettazione con emazie di montone, hanno dimostrato come i benefici dovuti alla completa prevenzione della GvHD non vengono vanificati né da un aumentata incidenza di rigetto né da un aumentato rischio di recidiva leucemica consentendo sopravvivenze in oltre il 60% dei pazienti a più di 10 anni dal trapianto (8). Risultati analoghi in termini di attecchimento e sopravvivenza libera da malattia sono stati anche riportati dal gruppo del Memorial Hospital di New York che, utilizzando una tecnica di T-deplezione ed un regime di condizionamento assolutamente simili a quelli impiegati dal gruppo di Perugia, ha completamente eliminato il rischio di rigetto che era di circa il 15% prima della correzione del regime di condizionamento con il siero anti-linfocitario e con il TT (9). Queste due esperienze, condotte in centri differenti ma con analoghe modalità, confermano che entrambi i problemi connessi con la T-deplezione (rigetto e recidiva) possono essere adeguatamente superati potenziando la capacità immunosoppressiva (con ATG) e quella mieloablativa (con TT) di un regime di condizionamento standard comprensivo di TBI e CY.

Negli anni successivi, la T-deplezione basata su metodiche immunofisiche è progressivamente uscita di scena da un lato per la laboriosità della procedura e dall'altro per la comparsa sul mercato di separatori cellulari in grado di selezionare le cellule CD34⁺ nel sangue periferico e di infondere inoculi ricchi in cellule CD34⁺ (megadose di staminali) e profondamente (4-5 log) T-depletati.

Questa innovazione tecnologica ha inoltre contribuito alla estensione del trapianto anche a pazienti privi di donatore compatibile che, come noto, è stata per anni la maggiore limitazione ad un più vasto impiego del trapianto di cellule emopoietiche. Sebbene oggi si disponga di ampi registri di donatori volontari e di banche di cordone ombelicale, oltre la metà dei pazienti eleggibili per un trapianto può solo contare su un donatore familiare incompatibile per 2-3 loci. Per molti anni, l'utilizzo di tali donatori si è rivelato clinicamente inefficace a causa dell'elevata incidenza di GvHD severa nei trapianti convenzionali e di rigetti in quelli sottoposti a T-deplezione (review in 10). Il rigetto del midollo incompatibile T-depletato è rimasto per anni ostacolo insormontabile nonostante il progressivo potenziamento del regime di condizionamento con l'adozione di TBI in dose singola al posto di quella iperfrazionata impiegata nei trapianti compatibili. Di fondamentale importanza nel superamento della barriera dell'istoincompatibilità sono stati gli studi nel modello murino che hanno dimostrato che l'infusione di una megadose (10 volte superiore al convenzionale) di cellule staminali ematopoietiche T-depletate consentiva l'attecchimento con ricostituzione ematopoietica full-donor nella quasi totalità degli animali trattati (10, 11).

La disponibilità dei fattori di crescita emopoietici e l'esperienza acquisita nel trapianto autologo con l'impiego delle cellule staminali del sangue periferico mobilizzate dopo chemioterapia ad alte dosi seguita dalla stimolazione con G-CSF o GM-CSF hanno reso possibile, anche nell'uomo, l'infusione di megadosi di cellule emopoietiche allogeneiche ai livelli che avevano consentito, nell'animale, il superamento della barriera dell'istoincompatibilità. In un primo studio pilota, il nostro gruppo ha applicato con successo il concetto della megadose di inoculo ad una serie di pazienti, per lo più adulti, con malattia leucemica avanzata (12).

Nel corso di questi ultimi anni, l'approccio al trapianto T-depletato da donatore familiare incompatibile è stato progressivamente evoluto e perfezionato. In particolare, la ricerca si è concentrata sul perfezionamento delle procedure di manipolazione delle cellule staminali periferiche e del regime di condizionamento. La variazione di maggior rilievo apportata al regime di condizionamento è stata la sostituzione, nel 1995, della CY con la fludarabina di cui era stato dimostrato il potente effetto immunosoppressivo sia in modelli murini (13) che in pazienti trattati per malattie linfoproliferative croniche senza una tossicità extra-ematopoietica. Per quanto concerne la manipolazione delle cellule staminali ematopoietiche periferiche, si è passati progressivamente dalla selezione negativa a quella positiva delle cellule CD34⁺ usando inizialmente il separatore CellPro (14) e poi, a partire dal 1999, quello più efficace della Milteny (15). La selezione positiva delle CD34⁺ ha consentito di infondere mediamente $2 \times 10^4/\text{kg}$ CD3⁺ e oltre $10 \times 10^6/\text{kg}$ CD34⁺. L'attecchimento primario si è ottenuto nel 93% dei casi (98% è stato quello globale considerando l'attecchimento dopo secondo trapianto) e la GvHD acuta severa così come la cronica estesa sono state efficacemente prevenute senza la necessità di un'addizionale immunosoppressione post-trapianto.

In un trapianto aploidentico l'intensa T-deplezione dell'inoculo è essenziale per il successo clinico poiché nel caso di un trapianto T-repleto l'alta frequenza di linfociti-T alloreattivi verrebbe ad associarsi ad un'alta incidenza di GvHD severa.

Tab. 1 - Caratteristiche cliniche dei pazienti con Leucemia Acuta sottoposti a trapianto da donatore familiare incompatibile.

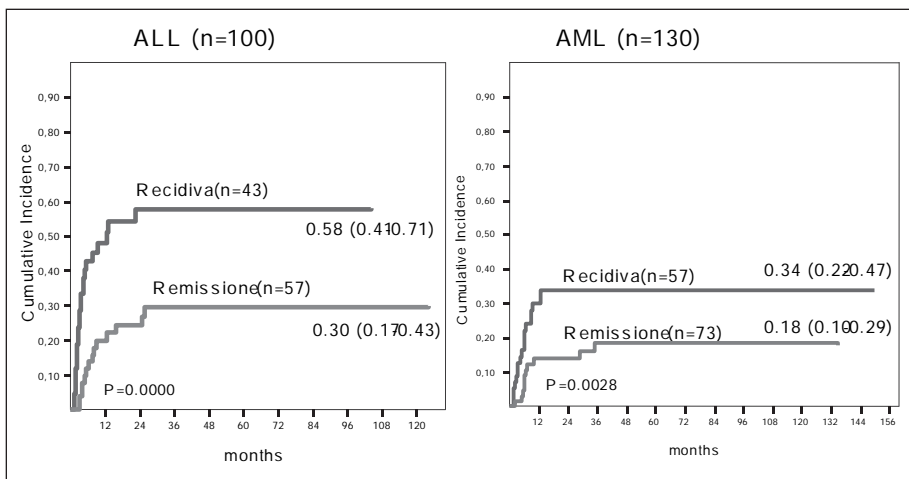
	ALL N = 100	AML N = 130	Totale N = 230
Età in anni:			
mediana	21	36	28.5
range	4-51	2-62	2-62
Stato al trapianto:			
CR I	23	28	51 (22%)
CR 2	26	32	58 (25%)
CR >2	9	12	21 (10%)
Recidiva	42	58	100 (43%)

All: Leucemia Acuta Linfoide; AML: Leucemia Acuta Mieloide

Per converso il rischio di un trapianto T-depletato è quello di un'assenza dell'effetto GvL e di conseguenza di un'aumentata incidenza di recidive leucemiche post-trapianto (1,3).

L'analisi dei pazienti con Leucemia Acuta trapiantati, a partire dal marzo 1993 (Tabella 1), ha evidenziato, nel gruppo in remissione ematologica (CR I e CR ≥II), un'incidenza cumulativa di recidiva pari a 0.18 (C.I. 95% 0.10-0.29) nei 73 pazienti con Leucemia Acuta Mieloide (LAM) e 0.30 (C.I. 95% 0.17-0.43) nei 57 con Leucemia Acuta Linfoide (LAL) (Figura 1). Risultati non differenti da quelli riportati in pazienti adulti sottoposti a trapianto non T-depletato da donatori volontari geneticamente non correlati (16) o da sangue di cordone ombelicale (17).

Nel nostro studio, l'aggiunta del thiotepa alla irradiazione corporea totale ed il conseguente maggior effetto mieloablativo del regime di condizionamento potrebbero aver compensato la perdita dell'effetto GvL, similmente a quanto è stato osservato nei trapianti T-depletati da familiari HLA identici (8, 9). È importante sottolineare che nella prevenzione della recidiva della LAM un ruolo impor-

**Fig. 1** - Recidiva dopo trapianto aploidentico.

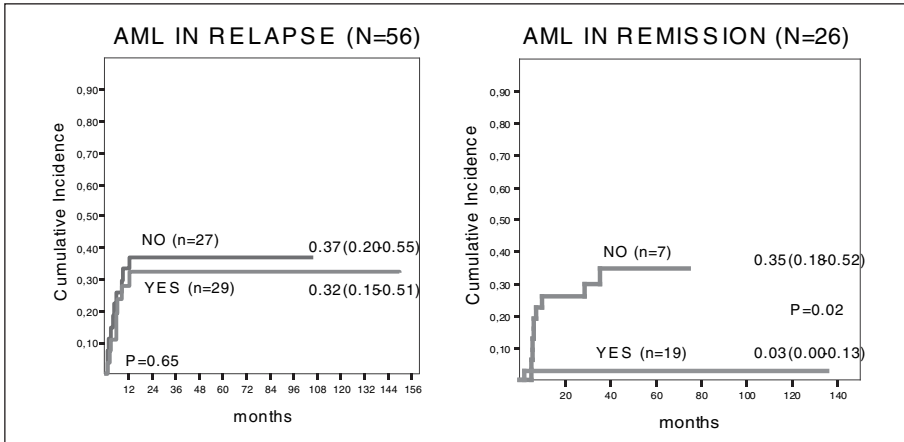


Fig. 2 - Recidiva in pazienti con AML trapiantati da donatore NK-alloreattivo.

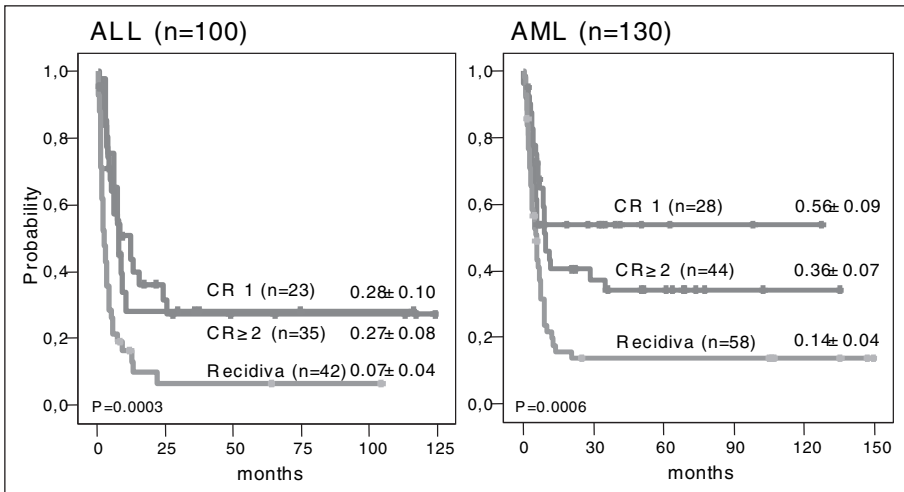


Fig. 3 - Sopravvivenza libera da eventi (EFS).

tante è svolto da un meccanismo biologico specifico del trapianto incompatibile: l'alloreattività esercitata dalla cellule Natural Killer (NK) del donatore verso il ricevente (18). In un trapianto aploidentico, in cui le cellule NK del donatore non riconoscono come "self" l'MHC del ricevente, il repertorio delle cellule NK emergenti dalle cellule staminali trapiantate è caratterizzato dalla presenza di un numero significativo di cloni NK che hanno un effetto alloreattivo verso il sistema emopoietico del ricevente senza cagionare GvHD. L'impatto clinico di questo fenomeno è evidente in pazienti con LAM trapiantati in fase di remissione da donatore NK-alloreattivo (Figura 2). La probabilità di Event-free Survival (EFS), al pari di quanto osservato in ogni altro tipo di trapianto da donatore alternativo, correla con il tipo e le fasi di malattia (Figura 3).

In conclusione, il trapianto aploidentico è oggi una realtà clinica che consente di prospettare ed effettuare il trapianto a tutti i pazienti che ne hanno indicazione indipendentemente dalla disponibilità di un donatore compatibile offrendo probabilità di guarigione sovrapponibili a quelle riportate per analoghe malattie, e fase di malattia, in pazienti trapiantati da donatore compatibile non familiare.

Bibliografia

1. Horowitz MM., Gale RP., Sondel PM et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990;7:555-62.
2. Reisner Y., Ben-Bassat I., Dourer D., et al. Demonstration of clonable alloreactive host cells in a primate model for bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4012-4015, 1986.
3. Marmont AM., Horowitz MM., Gale RP., et al. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* 1991; 78: 2120-30.
4. Aristei C., Aversa F., Raymondi C., Marsella AR., Panizza BM., Perrucci E., Piro F., Maranzano E., Lupattelli M., Martelli MF., Latini P. Allogeneic Matched T-Cell- Depleted Bone Marrow Transplantation for Acute Leukemia Patients. *Cancer J Sci Am* 1996; (2): 330.
5. Lapidot T., Terenzi A., Singer TS., et al. Enhancement by dimethyl myleran of donor type chimerism in murine recipient of bone marrow allografts. *Blood* 73: 2025-2032, 1989.
6. Terenzi A., Lubin I., Lapidot T., et al. Enhancement of T-cell-depleted bone marrow allografts in mice by thiotepa. *Transplantation* 50: 717-720, 1990.
7. Aversa F., Pelicci PG., Terenzi A., Carotti A., Felicini R., Mencarelli A., Donti E., Latini P., Aristei C., Martelli MF. Results of T-depleted BMT in chronic myelogenous leukaemia after a conditioning regimen that included thiotepa. *Bone Marrow Transplant.* 7 (Suppl 2): 24; 1991.
8. Aversa F., Terenzi A., Carotti A., et al. Improved outcome with T-cell-depleted bone marrow transplantation for acute leukemia. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1545-50.
9. Papadopoulos E., Carabasi MH., Castro-Malaspina H., et al. T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation as post-remission therapy for acute myelogenous leukemia: freedom from relapse in the absence of graft versus host disease. *Blood* 1998; 91: 1083-90.
10. Reisner Y., Martelli MF. Bone marrow transplantation across HLA barriers by increasing the number of transplanted cells. *Immunol Today* 16: 437-440, 1995.
11. Bachar-Lusting E, Rachamim N, Li HW, Lan F, Reisner Y : Megadose of T cell-depleted bone marrow overcomes MHC barriers in sublethally irradiated mice. *Nature Med* 1: 1268-1273, 1995.
12. Aversa F., Tabilio A. Terenzi A., et al. Successful engraftment of T-cell-depleted haploidentical "three-loci" incompatible transplants in leukemia patients by addition of recombinant human granulocyte colony-stimulating

- factor-mobilized peripheral blood progenitor cells to bone marrow inoculum. *Blood* 84: 3948-3955, 1994.
13. Terenzi A., Aristei C., Aversa F. et al. Efficacy of fludarabine as an immunosuppressor for bone marrow transplantation conditioning: Preliminary results. *Transplant Proc* 1996; 28: 3101.
 14. Aversa F., Tabilio A., Velardi A., et al. Treatment of high risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med* 339: 1186-1193, 1998.
 15. Aversa F., Terenzi A., Tabilio A., et al. Full-haplotype mismatched hematopoietic stem cell transplantation: A phase II study in patients with acute leukemia at high risk or relapse. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3447-54.
 16. Sierra J., Storer B., Hansen JA., et al. Unrelated donor marrow transplantation for acute myeloid leukemia: an update of the Seattle experience. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26: 397-404.
 17. Laughlin MJ., Barker J., Bambach B., et al. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med*. 2001; 44: 1815-22.
 18. Ruggeri L., Capanni M., Urbani E., et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295: 2097-2100; 2002.

Espansione di cellule staminali emopoietiche: speranza o realtà?

Wanda Piccibello, Loretta Gammaitoni, Ymera Pignochino

Laboratorio di Oncologia Medica, Dipartimento di Scienze Oncologiche,
Università di Torino, IRCC Institute for Cancer Research and Treatment, Candiolo, Torino

Le cellule staminali emopoietiche (HSC) sono caratterizzate dal possedere potenziale di autorinnovamento e differenziazione nelle diverse linee maturative del tessuto emopoietico. Tali proprietà si riflettono nella capacità di queste cellule di ricostituire in modo stabile e duraturo l'emopoiesi di un ricevente sottoposto a trattamenti mieloablativi (13, 19). Ad ogni successiva divisione cellulare delle HSC, le cellule figlie presentano un'erosione delle estremità cromosomiale a livello delle sequenze telomeriche correlata ad una progressiva riduzione della capacità proliferativa. Questo fenomeno è responsabile della senescenza cellulare e dell'induzione fisiologica dell'arresto proliferativo, verificabile sia in vitro che in vivo.

I telomeri sono strutture poste all'estremità dei cromosomi delle cellule eucariote che proteggono il DNA codificante da fenomeni di degradazione, fusione e ricombinazione. In cellule di mammifero le sequenze telomeriche sono unità ripetute di esanucleotidi (TTAGGG) non codificanti associate a diversi tipi di componenti proteiche. In assenza di meccanismi compensatori le cellule che si dividono vanno incontro a una graduale riduzione della lunghezza delle sequenze telomeriche ad ogni successiva replicazione dei filamenti di DNA. Quando l'accorciamento dei telomeri raggiunge un limite critico, la cellula interpreta questo segnale come potenziale danno a carico del DNA ed entra in senescenza smettendo di replicarsi oppure attiva un programma di morte cellulare per apoptosi (10). Uno dei meccanismi compensatori meglio caratterizzati in grado di mantenere o aumentare la lunghezza dei telomeri è mediato dall'enzima telomerasi che sintetizza e ripristina le sequenze telomeriche alle estremità dei cromosomi (31). Normalmente, nelle cellule somatiche di adulto questo enzima non è attivo, ma nelle cellule staminali emopoietiche permangono bassi livelli di attività telomerasica che possono aumentare in modo transiente dopo stimolazione con opportune citochine (30). La popolazione di cellule CD34⁺ presenta bassi livelli di attività telomerasica che aumenta in modo significativo quando le cellule progrediscono nel ciclo cellulare dalla fase G₀ di quiescenza cellulare alla fase S di replicazione del DNA (6, 7). Alcuni studi sperimentali dimostrano che il trattamento combinato con citochine in grado di attivare la progressione nel ciclo cellulare delle cellule staminali, ma

meno efficaci nel mantenere le proprietà di autorinnovamento in termine di proliferazione a lungo termine provocano l'attivazione dell'attività telomerica nelle prime fasi precoci di espansione in vitro e il suo rapido declino dopo 3-4 settimane di coltura (6, 7). Inoltre, 1-1.5 kbasi di DNA telomerico vengono perse dopo 3-4 settimane di coltura di cellule CD34⁺ ottenute da sangue di cordone ombelicale (CB), sangue periferico mobilizzato (MPB) o midollo osseo (BM). Quindi l'attività telomerica nelle HSCs limita ma non previene l'accorciamento dei telomeri. Dopo trapianto autologo o allogenico di HSC è stato osservato un accorciamento telomerico di 1-2 Kb (che corrisponde ad un prematuro invecchiamento di 15-40 anni) dovuto alla rapida autoreplicazione delle cellule staminali dopo l'infezione che garantisce la ricostituzione emopoietica (20, 29). La cinetica del ripopolamento midollare impone alle HSC un forte stress replicativo che risulta in un pronunciato effetto di invecchiamento e potrebbe accelerare l'insorgenza di disordine emoproliferativi clonali abitualmente associati all'età avanzata (26, 27). Inoltre, l'accorciamento telomerico riduce la rimanente capacità proliferativa delle cellule HSC verificabile in vitro in termini di numero di unità formanti colonie emopoietiche (CFU), e di cellule inizianti colture a lungo termine (LTC-IC) e può contribuire all'acquisizione di difetti genetici che sfociano nella comparsa di sindromi mielodisplastiche secondarie o leucemia mieloide acuta (26, 27). La lunghezza media delle sequenze telomeriche in cellule HSC ottenute da CB, MPB e BM è di 10.4 kb, 7.4 kb e 7.6 kb rispettivamente (6). Quindi le cellule HSC da CB posseggono un vantaggio proliferativo di circa 3kb rispetto alle cellule HSC da adulto. Se l'accorciamento dei telomeri è dovuto sostanzialmente all'eccessiva richiesta di autoreplicazione delle cellule HSC dopo trapianto per il ripopolamento del midollo, infondendo un numero maggiore di cellule staminali con telomeri più lunghi si indurrebbe uno stress replicativo minore. L'applicazione delle cellule HSC da CB per il trapianto allogenico è ad oggi possibile soltanto in campo pediatrico o per adulti di ridotta massa corporea a causa del limitato numero di cellule presenti in ogni singola raccolta (13, 16). L'espansione ex vivo delle cellule HSC neonatali è considerata di potenziale utilità clinica e studiata in trials clinici di fase I (12). Non solo sarà importante ottenere un gran numero di cellule staminali di modo tale che dopo trapianto non debbano subire un eccessivo numero di divisione per ricostituire l'emopoiesi dell'ospite, ma dovrà essere monitorata l'effettiva capacità di queste metodiche di generare cellule staminali dotate di un integro potenziale replicativo senza aver subito un eccessivo accorciamento telomerico già nelle fasi di espansione in coltura.

Espansione ex vivo di cellule CD34⁺ da CB

Il trapianto di cellule staminali in topi diabetici non obesi con immunodeficienza grave combinata (NOD/SCID) subletalmente irradiati rappresenta il metodo ottimale per la definizione e la caratterizzazione delle cellule emopoietiche più primitive (14, 23). Il modello murino NOD/SCID consente l'attecchimento di cellule HSC umane con un ampio potenziale proliferativo e di differenziazione multilineage e la conseguente ricostituzione di un'emopoiesi completa in riceventi

mieloablato (1, 2, 4, 23, 28). A differenza della maggioranza delle cellule LTC-IC che sono incapaci di ripopolare a lungo termine un ricevente mieloablato, le cellule umane ripopolanti a lungo termine il midollo di topi NOD/SCID (Scid Repopulating Cells: SRC) appartengono esclusivamente alla frazione cellulare che presenta un fenotipo CD34⁺CD38⁻ (1, 28). Inoltre, gli esperimenti di cinetica indicano che l'attecchimento delle SRC è seguito da un'ampia espansione delle cellule LTC-ICs in vivo, suggerendo che queste cellule derivano da un precursore più primitivo (2). Le nostre ricerche (9, 21, 23) hanno dimostrato come sia possibile ottenere l'espansione del numero di cellule CD34⁺ da CB mantenendo, anche a distanza di mesi dopo l'inizio della coltura in specifiche condizioni di crescita, una popolazione di cellule staminali in grado di originare cellule formanti aree Cobbelstone (CAFC), cellule LTC-IC e cellule SRC. Il numero delle cellule SRCs di CB può essere amplificato di molte volte in colture che possono arrivare fino a 10 settimane in presenza di particolari citochine quali: lo Stem Cell factor (SCF), ligando del recettore c-kit; il ligando di flt3/flk2 (FL), la trombopoietina, ligando del recettore c-mpl (TPO) e l'interleuchin 6 (IL-6); mantenendo la capacità di sostenere la ricostituzione emopoietica in trapianti seriali in topi NOD/SCID per tre generazioni.

Le colture a lungo termine stroma-indipendenti sono effettuate in un sistema continuo per 20 settimane oppure in un sistema frazionato che prevede l'isolamento specifico delle cellule CD34⁺ con metodo immunomagnetico ogni 4 settimane. L'applicazione del metodo frazionato permette di valutare mensilmente in modo diretto la popolazione di cellule CD34⁺ purificate. Il numero dei progenitori emopoietici (unità formanti colonie granulo-eritro monocitico macrofagiche: CFU-GEMM) continua ad espandersi in tutto il periodo di coltura di 20 settimane, ma l'espansione delle cellule staminali cessa dopo la sedicesima settimana come dimostrato dalla valutazione in vitro delle LTC-IC e dal test in vivo delle SRC. Trapiantando dosi limitanti di cellule CD34⁺ a diversi tempi dall'inizio della coltura abbiamo dimostrato l'espansione della popolazione di cellule staminali fino a 16 settimane di coltura in vitro, evidenziando l'aumento del numero delle cellule SRC. Invece cellule CD34⁺ derivate da midollo osseo adulto o da sangue periferico mobilizzato sottoposte alle stesse condizioni di coltura non sostengono l'espansione del comparto di cellule staminali oltre la quarta settimana di coltura. Questi risultati evidenziano il ridotto potenziale proliferativo delle cellule staminali adulte se paragonate con le cellule staminali neonatali. Ciò può essere causato da una maggiore tendenza delle cellule adulte ad entrare nel programma di differenziamento cellulare anziché in quello dell'autorinnovamento, oppure ad una più alta frequenza di apoptosi delle cellule staminali adulte rispetto a quelle neonatali che presentano sequenze telomeriche più lunghe (9).

Accorciamento telomerico delle cellule CD34⁺ di CB e attività telomerasica in vitro

La possibilità di mantenere HSC per lunghi periodi in vitro permette di valutare il ruolo dell'enzima telomerasi nel mantenimento della lunghezza dei telomeri

durante la replicazione cellulare e l'espansione del comparto staminale. Poichè studi precedenti dimostravano che il progressivo accorciamento dei telomeri delle cellule HSC è anticipato da trattamenti di espansione in vitro (7, 27) risultando comparabile a quello associato ad un normale invecchiamento di 20 anni, abbiamo monitorato l'attività telomerica e l'accorciamento dei telomeri nelle cellule CD34⁺ sottoposte alle nostre procedure di coltura a lungo termine basate sul trattamento combinato con miscele di citochine ottimali per l'espansione del numero di cellule SRC. Abbiamo dimostrato che in queste condizioni di coltura si ottiene l'espansione del numero di cellule CD34⁺ dovuto all'attiva replicazione per autorinnovamento, associata elevati livelli di attività telomerica che garantiscono il mantenimento della lunghezza dei telomeri per 4-5 mesi. I precursori emopoietici più primitivi valutati come CAFC e LTC-IC sono mantenuti fino alla sedicesima settimana di coltura e il loro numero risulta espanso di numerose volte. Durante questo periodo il potenziale di ripopolamento è mantenuto e il numero delle SRC è aumentato. Dopo questo periodo di stabilità della lunghezza dei telomeri (0-16 settimane), il DNA telomerico comincia ad accorciarsi e il numero delle LTC-IC e delle SRC originate dalla coltura inizia a diminuire. Applicando le nostre procedure di espansione si ottiene una proliferazione cellulare senza perdita di sequenze telomeriche grazie all'attivazione dell'enzima telomerasi nelle cellule CD34⁺ stimulate da opportune miscele di citochine. L'attività telomerica è esclusiva delle cellule CD34⁺ quindi la presenza di cellule emopoietiche più mature sottostima la valutazione dell'attività telomerica di 5-10 volte, quindi, apportando un fattore di correzione calcolato in base al numero delle CFC, si ottiene un valore di attività telomerica delle cellule HSC in queste colture paragonabile a quella delle cellule immortalizzate (7). Tali livelli sono inoltre comparabili con quelli presenti nelle cellule derivate da cloni di fibroblasti trasdotti con hTERT il gene che determina l'espressione costitutiva di una subunità telomerica che garantisce la proliferazione cellulare con mantenimento di una lunghezza telomerica stabile o aumentata (8, 17). Nelle colture a lungo termine stroma indipendenti le cellule CD34⁺ derivate da cordone ombelicale presentano un'attività telomerica elevata nelle prime 8 settimane, che scende fino al 25% dei livelli iniziali dalla ottava alla sedicesima settimana e al 12% alla ventesima settimana. Nelle cellule CD34⁺ adulte sottoposte alle nostre procedure di espansione l'attività telomerica è mantenuta nelle prime 3 settimane con lo stesso andamento di quella delle cellule CD34⁺ da cordone ombelicale nei primi due mesi di coltura, ma i livelli sono decisamente inferiori. Nella maggioranza delle colture cellulari da CB i telomeri rimangono stabili per oltre 3-4 mesi e solo negli ultimi stadi cominciano ad accorciarsi. In alcune colture di CB la lunghezza dei telomeri aumenta nel primo mese.

Alla terza settimana di colture le cellule CD34⁺ che originano da tessuto emopoietico adulto (BM e MPB) hanno subito un accorciamento di 0.1-0.3 kb rispetto alla lunghezza iniziale. La diminuzione del numero di cellule CD34⁺ recuperabili alla quarta settimana preclude la possibilità di misurare la lunghezza dei telomeri; comunque la misurazione sulla frazione cellulare non separata rivela un accorciamento di 0.7 kb. Questi risultati sono in contrasto rispetto a quelli otte-

nuti con le colture di CB che nello stesso periodo subiscono un allungamento di 0.9-1.0 kb. L'attività telomerica valutata sull'estratto proteico non tiene conto del contributo dell'enzima eventualmente localizzato a livello nucleare nel determinare l'attività biologica (16). Ciononostante l'attivazione della telomerasi è la spiegazione più plausibile per il mantenimento della lunghezza dei telomeri. Il tempo di divisione cellulare (population doubling: PD) delle HSC è di 24 ore quindi per un periodo di 20 settimane le HSC subiscono 140 divisioni. Con l'accorciamento medio di 50-100 bp/PD che si verifica nelle cellule prive di attività telomerica, 7-17 kb di DNA telomerico andrebbero perduti in 20 settimane se non ci fosse riattivazione dell'attività telomerica, provocando la precoce senescenza delle cellule in coltura. Anche considerando una divisione più conservativa ogni 48 ore le cellule subirebbero un accorciamento telomerico paragonabile a quello di un'intera vita. Da questo punto di vista le cellule di CB negli ultimi passaggi della coltura di 20 settimane sono paragonabili alle HSC adulte che presentano un potenziale proliferativo inferiore, un'attività telomerica ridotta e la mancanza di stabilizzazione della lunghezza telomerica (6, 27). Quindi la coltura di 20 settimane rappresenta il modello di uno stadio evolutivo dalla cellula staminale neonatale alla cellula staminale adulta.

Il modello in vitro è la rappresentazione della situazione in vivo?

Gli studi sull'accorciamento telomerico in granulociti, associato all'età, ha rivelato una perdita di sequenze telomeriche pari a 39 bp/anno, ma nei primi sei mesi l'accorciamento è molto più rapido (3 kb/anno) (20). Questo corrisponde a 15-30 divisioni cellulari di HSC nei primi sei mesi seguite da meno di 1 divisione di HSC per anno (27). Questo fenomeno non può essere predetto dagli esperimenti in vitro a meno che la divisione delle HSC nei primi sei mesi sia anch'essa bifasica, con telomeri stabili per i primi 3 mesi seguiti da rapida perdita dal momento in cui le HSC passano alla forma adulta, mentre sono ancora in attiva proliferazione. Molti studi hanno indagato l'accorciamento dei telomeri soprattutto a seguito di trapianti di HSC autologhi o allogenei (13, 20, 25, 26, 29). Sebbene un rapido accorciamento venga evidenziato nel primo anno dopo il trapianto (25), non sono state riportate evidenze di compromissioni dell'emopoiesi nella maggioranza dei casi (5), ma sono stati riportati casi in cui un fallimento tardivo del trapianto è associato a un significativo accorciamento telomerico (26). Probabilmente la più convincente evidenza dell'importanza dei telomeri è dato dall'associazione altamente significativa evidenziata tra la lunghezza dei telomeri nei leucociti circolanti e la mortalità in un gruppo di individui anziani sani (3). I soggetti con i telomeri più corti presentano una sopravvivenza inferiore, attribuibile all'insorgenza di patologie cardiache o infezioni. La perdita di anni di sopravvivenza media associata alla presenza di telomeri corti è di 4 anni per gli uomini e di 4.8 anni per le donne.

La possibilità di mantenere la lunghezza dei telomeri in sistemi di espansione di cellule HSC ha permesso la comprensione del ruolo della telomerasi nel mantenere stabile la lunghezza del telomero nelle cellule HSC neonatali. Ha inoltre

rivelato l'importante differenza tra HSC neonatali ed adulte relativa all'insorgenza della senescenza replicativa. Il potenziale beneficio clinico delle nostre osservazioni è indiscusso in quanto l'espansione di un gran numero di HSC da CB può essere ottenuto in colture a lungo termine senza la perdita di "qualità" come rivelato dagli esperimenti di trapianto in topi NOD/SCID e dalle misurazioni della lunghezza dei telomeri a fine coltura. L'espansione ex vivo può estendere il campo di applicazione del trapianto di cellule HSC da CB a tutti i riceventi adulti e potenzialmente anche a più riceventi, riducendo il rischio di un fallimento del trapianto causato da senescenza precoce delle HSC e la possibilità di una compromissione della sopravvivenza a lungo termine dei pazienti dovuta ad eccessivo accorciamento dei telomeri. Sconfortanti risultati sono stati ottenuti dal trapianto di cellule HSC da CB in dosi inferiori a $1.5 \times 10^7/\text{kg}$, o $1.7 \times 10^5 \text{ CD34}^+\text{cells/kg}$ (11). La raccolta di un singolo CB è generalmente sufficiente per l'attecchimento in pazienti pediatriche (età media 7 anni, 25 kg di massa corporea) e può raggiungere i limiti inferiori di accettabilità per il trapianto di adulti fino a 60 kg con il rischio di problemi nella ricostituzione emopoietica di larga parte degli individui con un ritardato recupero dell'adeguato numero di neutrofili. Inoltre, la sopravvivenza dei riceventi di trapianto di cellule HSC con 1 o 2 HLA-mismatched è migliorata dall'infusione di alte dosi cellulari (11, 24). Uno studio recente conclude che il raggiungimento di una dose di cellule nucleate di circa $3 \times 10^7/\text{kg}$ può prevenire l'effetto negativo dovuto a 1 HLA-mismatch (11, 24). Ottenere un'espansione ex vivo del numero cellule HSC da CB senza causare senescenza proliferativa offrirebbe una valida soluzione per il trapianto di riceventi adulti anche nel caso di 1-2 HLA mismatches.

Bibliografia

1. Bhatia M., Wang JCY., Kapp U., Bonnet D., Dick JE. Purification of primitive human hematopoietic cells of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 5320-5325.
2. Cashman JD., et al. Kinetic evidence of the regeneration of multilineage hematopoiesis from primitive cells in normal human bone marrow transplanted into immunodeficient mice. *Blood*. 1997; 89: 4307-4316.
3. Cawthorn RM., Smith KR., O'Brien E., Sivatchenko A., Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* 2003; 361: 393-395.
4. Conneally E., Cashman J., Petzer A., and Eaves C (1997) Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in non obese diabetic-scid/scid mice. *Proc. Natl. Acad. USA* 94: 9836-9841.
5. Engelhardt M., Finke J. Does telomere shortening count? *Blood* 2001; 98: 888.
6. Engelhardt M., Kumar R., Albanell J., Pettengell R., Han W., Moore MAS. Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood*. 1997; 90: 182-193.

7. Engelhardt M., MacKenzie K., Drullinsky P., Silver RT., Moore MAS. Telomerase activity and telomere length in acute and chronic leukemia, pre and post-ex vivo culture. *Cancer Res* 2000; 60: 610-617.
8. Franco S., MacKenzie KL., Dias S., Alvarez S., Raffi S., Moore MAS. Clonal variation in phenotype and lifespan of human embryonic fibroblasts (MRC-5) transduced with the catalytic component of telomerase (hTERT). *Exp Cell Res.* 2001; 268: 14-25.
9. Gammaitoni L., Weisel KC, Gunetti M., Wu KD, Bruno S., Pinelli S., Bonati A., Aglietta M., Moore MA., Piacibello W. Elevated telomerase activity and minimal telomere loss in cord blood long-term cultures with extensive stem cell replication. *Blood.* 2004 Jun 15; 103(12): 4440-8.
10. Granger MP., Wright WE., Shay JW. Telomerase in cancer and aging. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002; 41: 29-40.
11. Grewal SS., Barker JN., Davies SM., Wagner JE. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? *Blood.* 2003; 101: 4233-4244..
12. Jaroscak J., Goltry K., Smith A., et al. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex-vivo expanded UCB cells: results of a phase I trial using the Aastrom Replicell system. *Blood* 2003; 101: 5061-5067.
13. Kondo M., Wagers AJ., Manz MG., et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 759-806.
14. Larochelle A., et al. Engraftment of immune-deficient mice with primitive hematopoietic cells from beta-thalassemia and sickle cell anemia patients: implications for evaluating human gene therapy protocols. *Human Mol. Genet.* 1995; 4: 163-172.
15. Laughlin MJ., Barker J., Bambach B., et al. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med.* 2001; 344: 1815-1822.
16. Liu K., Hodes RJ., Weng N. Telomerase activation in human T lymphocytes does not require increase in telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein but is associated with hTERT phosphorylation and nuclear translocation. *J Immunol* 2001; 166: 4826-4830.
17. MacKenzie KL., Franco S., May C., Sadelain M., Moore MAS. Mass cultured human fibroblasts overexpressing hTERT encounter a growth crisis following an extended period of proliferation. *Exp Cell Res.* 2000; 259: 336-350.
18. Moore MAS. Commentary: Umbilical cord blood: an expendable resource. *J Clin Invest.* 2000; 105: 855-856.
19. Moore MAS. In vitro and in vivo hematopoiesis. In: Zucker-Franklin D, Greaves MF, Grossi CE, Marmont AM, eds. *Atlas of Blood Cells: Function and Pathology.* 3rd ed. Milan, Italy: Arti Grafiche Salea. 2003; 1-38.
20. Notaro R., Cimmino A., Tabarini D., Rotoli B., Luzzatto L. In vivo telomere dynamics of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13782

21. Piacibello W., Sanavio F., Garetto L., et al. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood*. 1997; 89: 2644-2653.
22. Piacibello W., Sanavio F., Garetto L., et al. Differential growth factor requirement of primitive cord blood hematopoietic stem cell for self-renewal and amplification vs proliferation and differentiation. *Leukemia* 1998; 12: 718-727.
23. Pflumio F., Izac B., Katz A., Shultz LD., Vainchenker W., Coulombel L. Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immunodeficient CB 7-severe combined immunodeficiency mice and non obese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells. *Blood*. 1996; 6: 1479-85.
24. Rubinstein P., Carrier C., Carpenter C., et al. (2000) Graft selection in unrelated placental/umbilical cord blood (PCB) transplantation: influence and weight of HLA match and cell dose on engraftment and survival [abstract]. *Blood*. 96: 588a.
25. Rufer N., Brummendorf TH., Chapuis B., Helg C., Landsdrorp PM., Roosnek E. Accelerated telomere shortening in hematological lineages is limited to the year following stem cell transplantation. *Blood* 2001; 97: 575-7.
26. Rufer N., Brummendorf TH., Chapuis B., Helg C., Landsdrorp PM., Roosnek E. Consequence of stem cell transplantation-induced telomere shortening. *Blood* 2001; 98: 889.
27. Vaziri H., Dragowska W., Allsopp RC., Thomas TE., Harley CB., Lansdrorp PM. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91: 9857-9860.
28. Vormoor J., et al. Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice. *Blood*. 1994; 83: 2489-2497.
29. Wynn RF., Cross MA., Hatton C., Will AM., Lashford LS., Dexter TM. Testa NG. Accelerated telomere shortening in young recipients of allogeneic bone-marrow transplants. *Lancet* 1998; 351: 178.
30. Zimmermann S., Glaser S., Ketteler R., Waller CF., Klingmuller U., Martens UM. Effects of telomerase modulation in human hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 2004; 22(5): 741-9.

Trapianto di cellule staminali emopoietiche del sangue placentare

Franco Locatelli, Maria Ester Bernardo, Tommaso Mina, Elena Bergami
Oncoematologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Università di Pavia

Per anni considerata materiale di scarto (dopo aver ottemperato al ruolo fondamentale di struttura di nutrimento indispensabile per un corretto e completo sviluppo embrio-fetale, oltre che per la creazione di una barriera anatomo-fisiologica di insostituibile utilità durante il corso della gravidanza), o al più impiegabile per preparazioni cosmetiche di dubbia efficacia, la placenta, ed in particolare il sangue contenuto nel cordone ombelicale, hanno recentemente trovato straordinaria valorizzazione come sorgente di cellule staminali emopoietiche (CSE) da impiegarsi per scopi trapiantologici. Il sangue placentare, infatti, contiene un elevato numero di cellule emopoietiche e, in particolare, una quota di progenitori emopoietici immaturi (quali le *long-term culture initiating cells*, LTC-IC e le *high proliferative potential colony forming cell*, HPP-CFC), più elevata rispetto al midollo osseo.¹ Numerosi studi hanno anche documentato come la capacità clonogenica delle CSE cordonali possa essere superiore a quella delle corrispettive cellule midollari (1-3).

Storicamente, per circa due decenni dalla prima realizzazione di una procedura trapiantologica coronata da successo (4, 5), il midollo osseo ha rappresentato l'unica sorgente di CSE da impiegarsi, sia in soggetti adulti, sia in soggetti pediatrici, per il trattamento di numerose emopatie maligne e non neoplastiche. Nella ricerca di fonti alternative di CSE utilizzabili per il trapianto allogenico, il 1988 rappresenta una tappa fondamentale nella storia della trapiantologia, in quanto, nell'ottobre di quell'anno, Eliane Gluckman, a Parigi, trapiantò con successo un bambino affetto da anemia di Fanconi, patologia ereditaria autosomica recessiva pressoché invariabilmente fatale entro la seconda decade di vita, utilizzando il sangue prelevato alla nascita dai vasi del cordone ombelicale di un fratello germano sano, oltre che HLA identico, con il paziente (6).

La guarigione di quel paziente e i favorevoli risultati clinici dei primi trapianti effettuati con il sangue placentare ottenuto da un donatore familiare (7, 8) hanno, in seguito, portato alla realizzazione di trapianti di sangue placentare da donatore non consanguineo e stimolato la nascita e un largo sviluppo di numerosi Centri di raccolta, manipolazione e criopreservazione (“banche”) del sangue placentare per

il trapianto tra soggetti non consanguinei (9-14). I vantaggi offerti da questi programmi di raccolta e criopreservazione del sangue placentare consistono nell'immediata disponibilità delle CSE e nella possibilità di raccogliere il sangue placentare presso gruppi etnici poco rappresentati nei Registri dei donatori di midollo. Entrambi questi fattori aumentano significativamente la possibilità di eseguire un trapianto in soggetti per i quali risulta difficile identificare un donatore compatibile. Non deve essere, altresì, trascurato che la raccolta di sangue cordonale alla nascita non comporta alcun rischio o detrimento per il neonato, né, tantomeno, per la madre, con ciò venendosi a configurare una condizione che risponde, anche eticamente, ai più nobili programmi di biosolidarietà umana. Attualmente, sono attivi a livello internazionale più di 30 programmi di raccolta e criopreservazione del sangue placentare basati su rigorosi criteri che garantiscono la qualità del prodotto per uso clinico (15) ed è stimabile che più di 300.000 unità di sangue placentare, criopreservate con completa caratterizzazione del contenuto cellulare e della tipizzazione HLA per i loci A, B e Dr, siano disponibili per trapianti da donatore non consanguineo. Si può ormai, senza dubbio, affermare che trapianti di sangue cordonale, sia da donatore familiare, ma ancor più numericamente da donatore non consanguineo, sono entrati nella pratica clinica corrente per il trattamento di pazienti pediatrici affetti da malattie ematologiche maligne o non neoplastiche, immunodeficienze congenite e, più raramente, da tumori solidi.

Indubbi vantaggi, ottenibili attraverso il trapianto di sangue di cordone ombelicale (TSCO), ineriscono fra gli altri, oltre che alla già ricordata immediata disponibilità dei progenitori emopoietici, ad un basso rischio di contaminazione virale del materiale trapiantato (i.e. Cytomegalovirus, virus di Epstein Barr, ecc.) e, soprattutto, ad una ridotta incidenza e severità della malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD) (16), motivata da caratteristiche immunologiche d'immaturità riferibile alla scarsa o assente pregressa esperienza antigenica dei linfociti del sangue cordonale, così come dalle interazioni materno-fetali tollerogeniche intercorse durante la gravidanza (3, 17-23). In particolare, i linfociti T di sangue placentare sono fenotipicamente e funzionalmente *naive* (come testimoniato dall'espressione preferenziale dell'isoforma RA della molecola CD45), avendo avuto un'esposizione ridotta o assente ad antigeni durante la vita intrauterina, la loro capacità citotossica in risposta alla stimolazione con alloantigeni è minore rispetto a quella mediata dai linfociti T di sangue adulto e, infine, i linfociti di sangue placentare mostrano una ridotta o assente risposta proliferativa ad alloantigeni in seguito a stimolazione secondaria. Anche le stesse cellule presentanti l'antigene (APC), nella loro espressione più efficace d'induzione di una risposta immunitaria cioè le cellule dendritiche (DC), presentano caratteristiche più favorevoli in termini di riduzione del rischio di sviluppare GVHD, essendo meno efficienti nella produzione di citochine che polarizzano la risposta infiammatoria in senso Th1 e mostrando caratteristiche fenotipiche d'immaturità (24).

La ridotta reattività immunologica dei linfociti del sangue placentare, oltre ad associarsi come già ricordato ad una riduzione del rischio di GVHD nelle sue forme acute e croniche, incontrovertibilmente documentata da rigorosi studi comparativi con pazienti con analoghe caratteristiche cliniche sottoposti a trapianto di

progenitori emopoietici midollari (12, 16), offre, altresì, la possibilità di effettuare il TSCO anche in assenza di completa identità per il sistema HLA fra donatore e ricevente.^{3,9} Larga parte dei TSCO ad oggi realizzati si sono fondati sull'impiego di donatori che differivano per 1 o anche per 2 antigeni del sistema HLA, ciò incrementando rilevantemente la possibilità di avviare al trapianto di CSE soggetti (come quelli già precedentemente citati appartenenti a gruppi etnici poco rappresentati nei Registri dei donatori di midollo) per i quali, a causa di una costituzione immunogenetica rara, risulta difficile identificare un donatore compatibile.

Si è nel corso di questi anni assistito ad un largo uso di progenitori emopoietici del sangue placentare in pazienti pediatriche o, comunque, con peso corporeo non superiore ai 40-50 kg. Quest'impiego preferenziale del TSCO in età pediatrica non stupisce, essendo, ad oggi, il limite applicativo del trapianto di CSE del sangue placentare costituito dal numero finito (mediamente compreso tra 8×10^8 e $1,5 \times 10^9$) di cellule, progenitori emopoietici e cellule facilitanti l'attecchimento, disponibili in un'unità di sangue cordonale. Questa quantità finita di progenitori del sangue placentare condiziona, in particolare per soggetti di peso corporeo superiore ai 40-50 Kg, sia una riduzione della probabilità di attecchimento delle CSE del donatore, sia un allungamento dei tempi di recupero granulocitario e piastrinico post-trapianto. Vi è chiara evidenza che la velocità di recupero emopoietico e la probabilità di attecchimento dell'emopoiesi del donatore correlano direttamente con il numero di cellule infuse (25). È stato, inoltre, inequivocabilmente documentato che il successo del trapianto di sangue placentare è strettamente dipendente dal numero di cellule infuse per kilogrammo di peso corporeo del paziente, tanto migliori essendo i risultati quanto più elevato è il numero delle cellule cordonali infuse (3, 9-14). Considerando che mediamente viene a perdersi attraverso la procedura di scongelamento circa un terzo delle cellule disponibili, è consuetudine presso i Centri di trapianto non selezionare, e, dunque, impiegare, unità in cui il contenuto cellulare pre-scongelamento sia inferiore a 2×10^7 cellule nucleate/Kg di peso corporeo del ricevente (25).

Esplicitata questa limitazione ad un più diffuso impiego del sangue cordonale anche in soggetti adulti, non sorprende che differenti strategie di ricerca clinica traslazionale siano state ipotizzate per superare questi vincoli applicativi del trapianto di sangue placentare.

Fra esse vi sono:

- 1) l'espansione *in vitro* delle CSE, identificate attraverso l'espressione della molecola CD34+ sulla superficie delle cellule presenti nel sangue placentare (26, 27);
- 2) l'infusione di due differenti unità di sangue cordonale in uno stesso paziente (28);
- 3) la co-infusione di cellule staminali mesenchimali (MSC) generate *ex vivo*, che, in modelli animali, si sono dimostrate in grado di promuovere l'emopoiesi sostenuta da progenitori emopoietici cordonali (29, 30).

Dati preliminari, recentemente pubblicati, hanno suggerito che il trapianto di due differenti unità di sangue placentare in pazienti adulti è in grado di migliorare significativamente l'esito del trapianto, riducendo il rischio di mortalità trapiant-

to-correlata (28). In particolare, i risultati ottenuti nei pazienti in remissione al momento del trapianto hanno suscitato particolare interesse. Già precocemente dopo il trapianto, in una larga parte dei pazienti, solo una delle due unità infuse contribuisce al sostenimento dell'emopoiesi e a 100 giorni dalla realizzazione della procedura, invariabilmente in tutti i pazienti, si ritrova evidenza dell'attecchimento di solo una delle due unità trapiantate. Speculativamente interessante è parimenti l'osservazione che, ad oggi, non si è identificato alcun fattore in grado di predire quali delle due unità prevarrà sull'altra. Né il numero delle cellule infuse, né il contenuto di elementi CD34+, così come la compatibilità HLA fra ricevente e le due unità infuse, correla con l'attecchimento preferenziale di un'unità rispetto ad un'altra. L'iniziale analisi statistica aveva suggerito che il numero di T-linfociti contenuti in ogni singola unità potesse predire l'attecchimento preferenziale dell'unità più ricca di cellule immunocompetenti (28). Tuttavia, con l'aumentare del numero dei casi sottoposti a trapianto di due unità questa correlazione statistica è andata perduta (Wagner J, comunicazione personale) e l'interrogativo biologico rimane aperto e, senza dubbio, meritevoli di ulteriori indagini.

La strategia di trapiantare due differenti unità poggia la sua potenzialità realizzativa sulla necessità di identificare, per ogni singolo paziente, due donatori di sangue placentare utilmente impiegabili in termini di compatibilità immunogenetica fra loro e con il ricevente (28). Concettualmente più intrigante, e di più larga applicabilità in linea di principio, è la strategia di procedere all'espansione *in vitro* dei progenitori emopoietici del sangue placentare. Numerosi gruppi di ricerca si sono dedicati all'identificazione delle migliori condizioni sperimentali per ottenere un'ottimale espansione delle CSE CD34+ e alcuni preliminari studi clinici (che hanno documentato la fattibilità e la sicurezza dell'approccio, ma non una sua particolare efficacia in termini di riduzione dei tempi di recupero granulocitario e piastrinico post-trapianto) sono stati pubblicati (26, 27, 31, 32). Recentemente, il nostro gruppo di ricerca ha realizzato un trapianto di cellule del sangue placentare espanse *in vitro*, infuse in un ricevente familiare HLA-identico, ottenendo, per la prima volta, la dimostrazione che, non solo è possibile moltiplicare il numero delle CSE in laboratorio, ma che i progenitori espansi sono funzionalmente attivi e in grado di contribuire al ripopolamento emopoietico, riducendo significativamente i tempi di recupero granulocitario e piastrinico post-trapianto. Questa esperienza, con la prova di principio che si è ottenuta, apre, dunque, rilevanti spiragli applicativi per estendere *routinariamente* l'uso del trapianto di CSE del sangue placentare a soggetti adulti o ad adolescenti con peso corporeo superiore ai 40-50 kg.

Numerosi studi hanno chiaramente dimostrato che, in pazienti pediatriche, il TSCO è in grado di fornire risultati equivalenti a quelli ottenibili con il trapianto di CSE midollari, sia nell'ambito dei trapianti da donatore familiare, sia nel contesto dei trapianti da donatore non consanguineo (12, 14, 16). In alcune situazioni particolari, quali quelle che ineriscono ai pazienti con emoglobinopatia (talassemia o anemia a cellule falciformi), il trapianto di CSE cordonali da donatore familiare HLA-compatibile si è dimostrato addirittura essere gravato da minori rischi di mortalità trapianto-correlata, soprattutto grazie alla riduzione della morbilità con-

nessa allo sviluppo di quadri di GVHD acuta o cronica (33). Pochi dubbi, poi, che, come già ricordato, l'immediata disponibilità delle CSE cordonali costituisca indubbio vantaggio per coloro che necessitano urgentemente di un trapianto allogenico (esemplificativamente pazienti con leucemie acute o con disordini congeniti del sistema immunitario) (3). Per i pazienti pediatrici, quindi, il TSCO da donatore non consanguineo rappresenta una valida opzione terapeutica in assenza di un donatore familiare HLA-compatibile, il cui impiego affianca e completa la possibilità di realizzare trapianti attraverso donatori non consanguinei di sangue midollare o di cellule staminali emopoietiche raccolte nel sangue periferico dopo opportune procedure di mobilizzazione.

Quanto rende ragione della maggior parte dei fallimenti delle procedure di TSCO, soprattutto nell'ambito dei trapianti da donatore non consanguineo, inerisce alla mortalità precoce (cioè osservata nei primi 100 giorni dal trapianto), cui contribuiscono significativamente complicanze infettive, motivate sia da un ritardo nell'attecchimento granulocitario, sia dalla mancanza di trasferimento adottivo di popolazioni linfocitarie con pregressa memoria immunologica verso determinati patogeni e, quindi, in grado di contribuire prontamente allo sviluppo di una risposta immunitaria in grado di conferire ottimale protezione anti-infettiva al ricevente. Iniziali riserve riferite a un possibile incremento del rischio di recidiva di malattia nei pazienti sottoposti a TSCO rispetto a quelli trapiantati con CSE midollari e attribuibile in linea di principio alla ridotta incidenza di GVHD acuta e cronica, non hanno, al contrario, trovato conferma nei vari studi clinici, essendosi, invece, ripetutamente dimostrato che l'impiego del sangue placentare si associa ad un effetto di tipo *graft-versus-leukemia* (GVL) non inferiore rispetto a quanto osservato con altri tipi di trapianto di CSE (12, 14, 16). La possibilità di impiegare donatori HLA-parzialmente compatibili, al riguardo, può contribuire a compensare, almeno parzialmente, la riduzione della componente GVHD-correlata dell'effetto GVL. Dal punto di vista immunobiologico, giova anche ricordare come evidenze sperimentali indichino che cellule LAK placentari sono perfettamente in grado di determinare la lisi di blasti leucemici e che la loro attività verso linee cellulari quali le cellule Daudi o YAC-1 è maggiore rispetto a quanto osservato con cellule LAK provenienti da sangue midollare (17).

Sebbene il numero di pazienti adulti trapiantati con CSE cordonali sia pari a circa un terzo di quello relativo a pazienti pediatrici, indiscutibilmente, negli ultimi anni, si è fatto più largo uso del TSCO anche in pazienti adulti, privilegiando l'impiego di unità a più ricco contenuto cellulare. Recentemente, tre differenti studi, che valutavano coorti numericamente consistenti di pazienti affetti da empatie maligne, hanno posto a confronto i risultati ottenuti utilizzando CSE midollari e placentari da donatore non consanguineo in pazienti adulti.³⁴⁻³⁶ Il primo di questi, condotto su pazienti registrati all' *European Blood and Marrow Transplantation* (EBMT) Group ha mostrato risultati sostanzialmente comparabili impiegando CSE cordonali o midollari, suggerendo che il TSCO da donatore non consanguineo (in larga parte effettuato impiegando donatori HLA-diversi rispetto al ricevente) rappresenta nell'adulto una valida alternativa al trapianto di midollo osseo da donatore non consanguineo HLA-identico (35). Nello studio

nordamericano, al contrario, si sono dimostrati risultati complessivamente peggiori nei riceventi un TSCO da donatore non consanguineo non HLA-compatibile rispetto a quelli documentabili con il trapianto di CSE midollari da donatore non consanguineo HLA-identico, essendo, invece, simile la probabilità di sopravvivenza rispetto a soggetti adulti sottoposti a trapianto midollare da donatore *HLA-mismatched* (36). Un'esperienza mono-istituzionale condotta in Giappone, in pazienti in larga parte con sierologia negativa per cytomegalovirus e con un peso corporeo mediano di 56 kg, ha addirittura mostrato percentuali di sopravvivenza significativamente superiori in pazienti sottoposti a TSCO da donatore non consanguineo, rispetto a pazienti, con analoghe caratteristiche cliniche, trapiantati con CSE midollari da donatore non consanguineo.

Bibliografia

1. Broxmeyer HE., Douglas GW., Hango G., et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 3828-3832.
2. Broxmeyer HE., Kurtzberg J., Gluckman E., et al. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. *Blood Cells* 1991; 17: 313-329.
3. Gluckman E., Locatelli F. Umbilical cord blood transplants. *Curr Opin Haematol* 2000; 7: 353-357.
4. Bach FH., Albertini RJ., Anderson JL. et al. Bone marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* 1968; 2: 1364-1366.
5. Gatti RA., Meuwissen HJ., Allen HD. et al. Immunological reconstitution of sex linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968; 2: 1366-1369.
6. Gluckman E., Broxmeyer HA., Auerbach AD., et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321: 1174-8.
7. Wagner JE., Kernan NA., Steinbuch M., et al. Allogenic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet* 1995; 346: 214-219.
8. Locatelli F., Maccario R., Comoli P., et al. Hematopoietic and immune recovery after transplantation of cord blood progenitors cells in children. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18: 1095-1101.
9. Gluckman E., Rocha V., Boyer-Chammard A., et al. Outcome of cord blood transplantation from related and unrelated donors. *N Engl J Med* 1997; 337: 373-81.
10. Rubinstein P., Carrier C., Scaradavou A., et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 1998; 339: 1565-77.
11. Locatelli F., Rocha V., Chastang C., et al. Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. Eurocord-Cord Blood Transplant Group. *Blood*. 1999 93: 3662-3671.

12. Rocha V., Cornish J., Sievers EL., et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001; 97: 2962-71.
13. Wagner JE., Barker JN., DeFor TE., et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002; 100: 1611-1618.
14. Barker JN., Davies SM., DeFor T., et al. Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. *Blood* 2001; 97: 2957-61.
15. Bone Marrow Donors Worldwide website.
16. Rocha V., Wagner J., Sobocinski KA., et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med* 2000; 342: 1846-1854.
17. Gardiner CM., O'Meara A., Reen DJ. Differential cytotoxicity of cord-blood and bone marrow-derived natural killer cells. *Blood* 1998; 91: 207-212.
18. Risdon G., Gaddy J., Stehman FB., Broxmeyer HE. Proliferative and cytotoxic responses of human cord blood T lymphocytes following allogenic stimulation. *Cell Immunol* 1994; 154: 14-24.
19. Keever C., Abu-Hajir M., Graf W., et al. Characterization of the alloreactivity and anti-leukemia reactivity of cord blood mononuclear cells. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 407-419.
20. Risdon G., Gaddy J., Horie M., Broxmeyer HE. Alloantigen priming induces a state of unresponsiveness in human umbilical cord blood T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2413-2417.
21. Harris DT., Schumacher MJ., Locascio J., et al. Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10006-10010.
22. Chalmers IMB., Janossy G., Contreras M., et al. Intracellular cytokine profile of cord and adult blood lymphocytes. *Blood* 1998; 92: 11-18.
23. Madrigal JA., Cohen SBA., Gluckman E. et al. Does cord blood transplantation result in lower graft-versus-host-disease? It takes more than two to tango. *Human Immunol* 1997; 56: 1-5.
24. Kogler G., Wernet P. *Blood*.
25. Gluckman E., Rocha V., Arcese W., et al. Eurocord Group. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp Hematol* 2004; 32: 397-407.
26. Shpall EJ., Quinones R., Giller R., et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8: 368-376.
27. Jaroscak J., Goltry K. Smith A., et al. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the AastromReplicell System. *Blood* 2003; 101: 5061-5067.

28. Barker JN., Weisdorf DJ., Defor TE., et al. Transplantation of two partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 2005; 105: 1343 - 1347.
29. Noort WA., Kruisselbrink AB., in't Anker PS., et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34⁺ cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2002; 30: 870-878.
30. Fibbe WE., Noort WA. Mesenchymal stem cells and Hematopoietic stem cell transplantation. *Ann NY Acad Sci* 2003; 996: 235-244.
31. Piacibello W., Sanavio F., Severino A., et al. Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34(+) cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood*. 1999; 93: 3736-49.
32. Peled T., Landau E., Mandel J., et al. Linear polyamine copper chelator tetraethylenepentamine augments long-term ex vivo expansion of cord blood-derived CD34⁺ cells and increases their engraftment potential in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2004; 32: 547-555.
33. Locatelli F., Rocha V., Reed W., et al. Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease. *Blood* 2003; 101: 2137-2143.
34. Laughlin MJ., Eapen M., Rubinstein P. et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* 2004; 351: 2265-2275.
35. Rocha V., Labopin M., Sanz G. et al. Outcomes after transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med* 2004; 351: 2276-2285.
36. Takahashi S., Iseki T., Ooi J. et al. Single-institute comparative analysis of unrelated bone marrow transplantation and cord blood transplantation for adult patients with hematological malignancies. *Blood* 2004; 104: 3813-3820.

**PROSPETTIVE
DI TERAPIA CELLULARE**

Dendritic cell vaccination for multiple myeloma using patient-specific tumor idiotype protein or idiotype (VDJ)-derived class I-restricted peptides

Roberto M. Lemoli

Institute of Hematology and Medical Oncology “L. & A. Seràgnoli”, University of Bologna, and Stem Cell Research Center, S.Orsola-Malpighi Hospital, Bologna

Dendritic cells (DCs) are professional antigen-presenting cells showing the most potent stimulatory activity on T-cell immunity (1). Murine DCs loaded with tumor-associated antigens, induce specific anti-tumor responses *in vitro* and *in vivo* (1, 2). In humans, several pilot clinical trials support the role of DCs in anti-tumor immunity (2).

Early data on DC vaccination of multiple myeloma (MM) and lymphoma patients indicate that stimulation of an anti-idiotype (Id) T-cell response may sometimes be feasible (2).

However in MM, the heterogeneity of the trial designs (e.g source of DCs, route of administration, number of injections, patient selection and antigen formulation) as well as the functional deficiencies of circulating DCs (3) and Id-specific T cells, which often become tolerant by peripheral (4) or central (5) deletion as disease progresses, and the limited number of patients enrolled in each trial may account for the modest number of immune responses observed and the poor clinical results.

CD14⁺ monocytes from MM patients can be reproducibly induced to differentiate into fully functional, mature, CD83⁺ DCs according to Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines (6, 7). Here, we report the safety profile, the immunologic and clinical evaluation of DC therapy in 15 MM patients with low tumor burden after tandem autologous stem cell transplantation (ASCT) who did not tolerate maintenance therapy or showed initial signs of disease progression under therapy. The trial was designed to assess the role of:

- 1) two different routes of DC vaccine administration (subcutaneous, sc; or intravenous, iv);
- 2) increasing doses of Id-pulsed DCs;
- 3) two types of Id formulation (i.e. whole protein or Id-derived peptides).

Patients and methods

Patients

Fifteen patients with symptomatic MM who had received double ASCT were enrolled in this phase I/II study. The clinical characteristics of study patients are reported in Table 1. After transplantation, MM patients were initially treated with interferon- α (IFN) (3 MU 3 times/week) as maintenance therapy. Monthly dexamethasone (Dex) was added in case of disease progression. DCs were administered to 4 patients, who did not tolerate maintenance treatment, before any serologic MM progression, and to 11 relapsing patients. This trial was approved by the Italian Ministry of Health (N.8136-Di21-783) and the local ethical committee (28/2002/U). Informed consent was obtained from study patients prior to enrollment according to the Declaration of Helsinki.

Tumor antigen

Peptides derived from the VDJ IgH gene rearrangements were produced for the nine patients, for whom monoclonal Ig was not available. The VDJ gene rearrangement was identified for each patient as previously reported (8, 9). The putative amino-acidic sequence corresponding to each patient-specific VDJ IgH region was obtained from the ExPASy Proteomic Server (www.expasy.org). By applying structural prediction models derived either from the BioInformatics & Molecular Analysis Section of The National Institutes of Health web site or from the International Immunogenetics Information System® web site (<http://bimas.cit.nih.gov> and <http://imgt.cines.fr>, respectively) all the Ig-deduced protein sequences were evaluated for peptides of nine and ten aminoacids in length, which could potentially bind to MHC class I molecules. For each patient, two peptides were selected: one deriving from the three complementary determining regions (CDR) IgH rearranged regions and one from the framework (FW) IgH rearranged region. The peptides were selected according the highest prediction score. In two cases, only peptides from FW3 and FW2 were chosen due to the exceedingly low score of CDR-derived peptides (Table 1).

Monoclonal IgG or IgA were purified from serum using protein-G column (Hi Trap protein G Sepharose, Pharmacia Biotech, Uppsala Sweden) as reported elsewhere (10).

Production of DC-based vaccine

Monocyte-derived DCs were generated and loaded with the tumor antigen (50 mg/mL) and keyhole limpet hemocyanin (KLH, Byosin, Germany; 50 mg/mL) as earlier reported (6, 7).

Trial design and immunoresponse to DC vaccination

DC-based immunotherapy consisted of 3 sc and 2 iv administrations, 2 weeks apart, at increasing doses of 5x-, 10x-, 50x10⁶ cells and 10x-, 50x10⁶ cells, respectively. Additional sc monthly injections of 50x10⁶ DCs were scheduled in case of stable disease and DC availability. A careful analysis was performed to test

Tab. 1 - Clinical characteristics of study patients and vaccine formulation.

Pts	Sex/Age	Stage	Ig Isotype	Pre-Vax Status	Auto-Tx (N=2) Cond.	Time from Tx (Months)	Id Formulation Whole protein	Formulation Peptides
1	F/61	II A	IgG/k	VGPR	MEL BU-MEL	60	IgG+KLH	-
2	M/55	I A	IgG/k	PROGRESSION	MEL BU-MEL	30	IgG+KLH	-
3	M/50	III A	IgA/k	VGPR	MEL BU-MEL	60		ARVGAWAEAFD(10) CDR3 DNAKNSLYL(9) FW3 +KLH
4	M/63	III A	IgA/k	VGPR	MEL BU-MEL	60		SLIVADTAL(9)FW3 AIVALPDDL(9) CDR3+KLH
5	F/59	I A	IgG/k	VGPR	MEL BU-MEL	30	IgG+KLH	-
6	M/55	II A	IgG/k	PROGRESSION	MEL BU-MEL	61		RLSPGKALE(9) FW2 RVVIAASSP(9) CDR3+KLH
7	M/54	I A	IgG/k	MCR	MEL BU-MEL	19		FTNYDINWV(9) CDR1 SLTSDDTAV(9) FW3+KLH
8	M/37	III A	IgG/k	PROGRESSION	MEL BU-MEL	18	IgG+KLH	-
9	M/59	III A	IgG/k	PROGRESSION	MEL BU-MEL	73		YDSGERWRL(9) CDR3 YIISDADSV(9) CDR2/FW3+KLH
10	M/62	I A	IgG/k	CR	MEL BU-MEL	9		SLRAEDTAV(9) FW3 QAPGKGLEWV(10) FW2+KLH
11	M/59	I A	IgA/k	PR	MEL BU-MEL	108	IgA+KLH	-
12	M/68	I A	IgA/ λ	PROGRESSION	MEL BU-MEL	48		SLRVEDTALY(10) FW3 ALYYCAKEDY(10) FW2+KLH
13	F/58	I A	IgG/k	PROGRESSION	MEL BU-MEL	25		FCARVLRDV(9) FW3 SLRLTSVTA(9) CDR3+KLH
14	F/54	I A	IgG/ λ	VGPR	MEL BU-MEL	88		SLESRLAISV(10) FW2 SPLDSAGYSK(10) CDR3+KLH
15	M/66	III A	IgA/ λ	PR	MELMEL	24	IgA+KLH	-

Legend: GPR, very good partial remission; MCR, molecular complete remission; CR, complete remission; PR, partial remission; MEL, melphalan; BU, busulphan; Tx, transplantation.

whether the two different routes of administration (i.e. sc and iv), increasing DC doses, as well as different tumor antigen formulations, resulted in efficient T-cell responses or toxicity. Humoral and T-cell responses were evaluated according to previously published conventional assays (11-14).

Results and discussion

KLH-specific immune response

All evaluable patients (n = 14) showed a KLH-specific antibody response. Nine out of 14 patients showed a KLH-specific T-cell proliferative response, 8/14 showed a significant increase in the concentration of circulating KLH-specific IFN- γ secreting T cells after the third vaccination, and 9/14 had a positive delayed-type hypersensitivity reaction (DTH) test. T-cell responses became measurable after the first DC injection, the peak values were observed after the third vaccination and decreased thereafter as shown in Fig.1.

Thus, despite heavy prior treatment, MM patients retained a certain degree of immunocompetence and mounted B- and T-cell primary immunoresponses to a strong xenoantigen.

Id-specific immune response

None of the patients mounted a detectable Id-specific antibody response. Conversely, 7/14 patients showed an Id-specific T-cell proliferative response that was not present before vaccination. Moreover, 7/14 significantly increased IFN- γ -secreting T-cell levels measured by ELISPOT analysis after the third vaccination, and 4/14 demonstrated an Id-positive DTH test. T-cell response peaked after the third sc DC injection, and declined thereafter (Figure 1).

Anti-Id proliferation was restored up to 1 year by sc DC injection in 3/3 patients (N.2, 7, 10) who received 1, 3 and 4 additional monthly sc DC injections, respectively, (Figure 1d). Anti-Id T-cell immune responses were similar in patients receiving the Id as whole protein or VDJ-derived peptides (data not shown).

The frequency of anti-Id CTLp was assessed at one year from DC vaccination in 2 patients (N. 2 and 10) with stable disease. As shown in Figure 2a, infusion of Id-pulsed DCs increased the frequency of cytotoxic T cells. In one patient (N. 10), vaccinated with FW-derived peptides, we demonstrated the development of anti-tumor T-cell proliferative (Figure 2c) and cytotoxic responses (Figure 2b) to both peptides and their combination was synergistic.

Safety and clinical outcome

There were no serious adverse events during DC therapy regardless of the number of DCs infused or the route of administration. No significant changes in routine blood values nor evidence of any autoimmune reaction were recorded.

Overall, 6/14 evaluable patients have stable serologic disease, one patient achieved PR and seven patients progressed. One other patient (N. 15) is presently evaluable only for safety and not for DC therapy efficacy due to the limited follow up time (1 month). Specifically, 6/8 patients in CR or VGPR showed stable

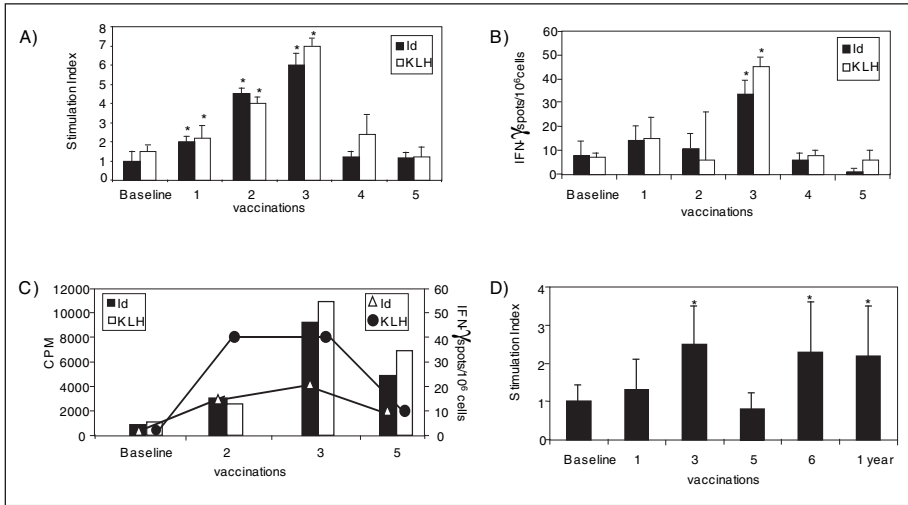


Fig. 1 - Kinetics of the immune response to DC-based anti Id vaccination. T-cell proliferative responses (i.e. >50% increase compared to baseline) and the concentration of PB IFN- γ producing T cells are reported in panels A and B, respectively, for all (=14) treated patients. The correlation between these two T-cell activation parameters is clearly demonstrated in panel C depicting a representative clinically responding patient (N. 2). Overall, T-cell responses become measurable after the first sc DC injection, the peak values are observed after the third sc vaccination with the highest number of DCs (i.e. 5×10^7) and decrease after iv injections regardless of the number of DCs infused (i.e. 1 or 5×10^7). Anti-Id proliferation, which was found to be decreased after iv infusion, was restored in 3 patients (N. 2, 7, 10) by sc injection of 5×10^7 DCs and the proliferative response lasted up to one year following therapy (D). The data are presented as mean \pm SD and were compared using Wilcoxon's test. P values for T-cell proliferation to Id and KLLH were statistically significant (*, <0.05) after the first, second and third vaccination. ELISPOT assay showed statistically significance (*, <0.05) after the third s.c. vaccination.

disease after a median of 26 months from vaccination. Conversely, only 1/6 patients vaccinated in progression achieved PR which is maintained at 40 months from treatment. In this last case, the decrease of serum M-component was strictly associated with the development of an anti-Id proliferative T-cell response (Figure 2d).

Our data demonstrate the efficacy of *ex-vivo*-generated DCs to stimulate T-cell responses in MM patients. Half of the study patients showed an anti-Id T-cell proliferative response, increased numbers of Id-specific IFN- γ -secreting T cells and, in some cases, enhanced CTL-p frequency and positive DTH reaction despite the immunogenic weakness of the tumor Id. Interestingly, we found peak values after the third sc injection followed by a rapid decline concomitant with iv infusion. Anti-Id T-cell responses were then restored in 3/3 patients who received additional sc injections of 50×10^6 DCs. Thus, we provide evidence that sc administration is more effective than iv infusion to induce immunological responses as shown in melanoma patients (15). The immunological responses were not different between patients immunized with the whole Id protein or Id (VDJ)-derived patient-specific peptides. Thus, our epitope-prediction analysis was effective in identifying peptides that could potentially bind to one or more HLA molecules

expressed by the patients and these epitope represent a target for T-cell reactivity. Contrasting results are available on the capacity of FW-derived peptides to stimulate T cells (16, 17). In our study, we showed, in one evaluable patient, the post-vaccination increase of CTLp for neoplastic plasma cells following the administration of FW-derived peptides-pulsed DCs. We chose to utilize only HLA class I-restricted peptides because of limitations of the structural prediction models employed in this study and the effectiveness of such peptides in eliciting T-cell responses (15). KLH was then used as a “helper” epitope to potentiate the vaccine formulation (18). However, given the importance of CD4⁺ cells in maximizing anti-tumor cytotoxicity, future trials should likely include HLA class II peptides.

Experimental and preliminary clinical data have emphasized the role of anti-tumor vaccination in the elimination of minimal residual disease (2). Our results support this notion, since 6 of 8 patients vaccinated in CR or VGPR showed stable disease without further treatment after a median follow up of 26 months whereas only 1/6 patients vaccinated with overt disease achieved PR.

In summary, whereas iv administrations of DCs were ineffective to stimulate T-cell responses, sc injections of cryopreserved idiotype-pulsed DCs were safe and induced anti-MM immunological responses regardless of the loading antigen formulation.

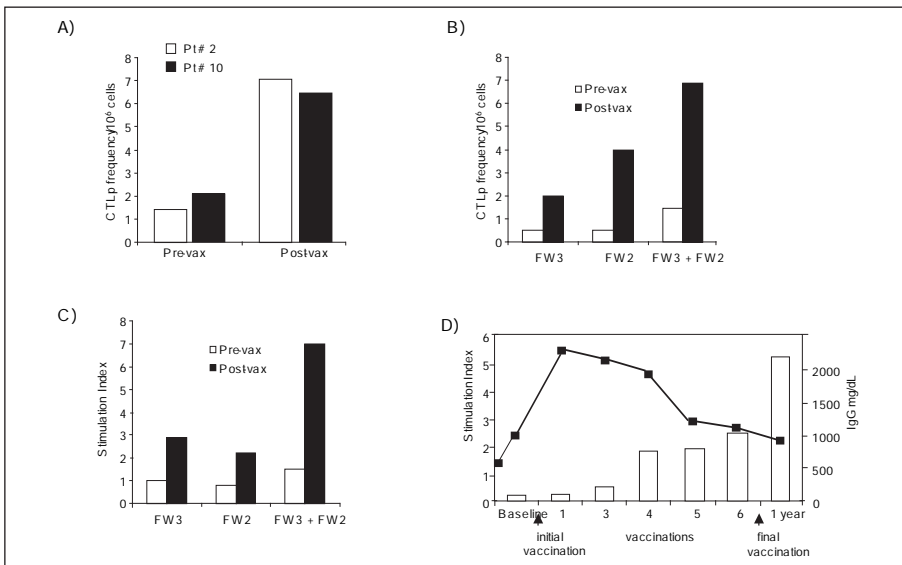


Fig. 2 - Increased frequency of anti-Id CTLp following DC vaccination. In 2/2 evaluable patients CTLp frequency was found to be increased one year after DC vaccination (A). One of the two patients showing increased CTLp frequency after treatment was vaccinated with FW-derived peptides. In this case, we demonstrated the development of proliferative (C) and cytotoxic T-cell response (B) to both peptides and their combination was synergistic (B, C). One of the two MM patients (N. 2) achieved PR which is maintained after 40 months. The decrease of serum M-component (indicated by the solid line) was strictly associated with the development of an anti-Id T-cell response (empty bars) (panel D).

References

1. Bancherou J., Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-52.
2. Bocchia M., Bronte V., Colombo MP., et al. Antitumor vaccination: where we stand. *Haematologica* 2000; 85: 1172-1206.
3. Ratta M., Fagnoni F., Curti A., et al. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: The role of interleukin-6. *Blood* 2002; 100: 230-7.
4. Bogen B. Peripheral T-cell tolerance as a tumor escape mechanism: deletion of CD4+ T cells specific for a monoclonal immunoglobulin iditype secreted by a plasmacytoma. *Eur J Immunol* 1996; 26: 2671-9.
5. Lauritzsen GF., Hoofgard PO., Schenk K., Bogen B. Clonal deletion of thymocytes as a tumor escape mechanism. *Int J Cancer* 1998; 78: 216-22.
6. Ratta M., Curti A., Fogli M., et al. Efficient presentation of tumor iditype to autologous T-cells by CD83+ dendritic cells derived from highly purified circulating CD14+ monocytes in multiple myeloma patients. *Experimental Hematology* 2000; 28: 931-40.
7. Motta MR., Castellani S., Rizzi S., et al. Generation of dendritic cells from CD14+ monocytes positively selected by immunomagnetic adsorption for multiple myeloma patients enrolled in a clinical trial of anti-iditype vaccination. *Br J Haematol* 2003; 121: 240-50.
8. Lemoli RM., Martinelli G., Zamagni E., et al. Engraftment, clinical and molecular follow-up of patients with multiple myeloma who were reinfused with highly purified CD34+ cells to support single or tandem high-dose chemotherapy. *Blood* 2000; 95: 2234-9.
9. Martinelli G., Terragna C. Lemoli RM., et al. Molecular remission after allogeneic or autologous transplantation of hematopoietic stem cells for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2273-81.
10. Curti A, Isidori A, Ferri E, et al. Generation of dendritic cells from positively selected CD14+ monocytes for anti-tumor immunotherapy. *Leukemia Lymphoma* 2004; 45: 1419-28.
11. Massaia M., Borrione P., Battaglio S., et al. Iditype vaccination in human myeloma: generation of tumor-specific immune responses after high-dose chemotherapy. *Blood* 1999; 94: 673-83.
12. Coscia M., Mariani S., Battaglio S., et al. Long-term follow-up of iditype vaccination in human myeloma as a maintenance therapy after high-dose chemotherapy. *Leukemia* 2004; 18: 139-45.
13. Comoli P., Montagna D., Moretta A., et al. Alloantigen-induced human lymphocytes rendered non responsive by a combination of anti-CD80 monoclonal antibodies and cyclosporin-A suppress mixed lymphocyte reaction in vitro. *J Immunol* 1995; 155: 5506-11.
14. Comoli P., Pedrazzoli P., Maccario R., et al. Cell therapy of stage IV nasopharyngeal carcinoma with autologous Epstein-Barr virus-targeted cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8942-9.

15. Thurner B., Haendle I., Roder C., et al. Vaccination with Mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induce regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 1999; 190: 1669-78.
16. Trojan A., Schultze JL., Witzens M., et al. Immunoglobulin framework-derived peptides function as cytotoxic T-cell epitopes commonly expressed in B-cell malignancies. *Nat Med* 2000; 6: 667-72.
17. Baskar S., Kobrin CB., Kwak LW. Autologous lymphoma vaccines induce human T-cell responses against multiple unique epitopes. *J Clin Invest* 2004; 113: 1498-1510.
18. Timmerman JM., Levy R. Linkage of foreign carrier protein to a self-tumor antigen enhances the immunogenicity of a pulsed dendritic cell vaccine. *J Immunol* 2000; 164: 4797-4803.

L'utilizzo di cellule CIK per la recidiva dopo trapianto di midollo osseo allogenico

M. Introna, M. Franceschetti, A. Rambaldi

U.S.C. di Ematologia, e Laboratorio di Terapia Cellulare e Genica "G. Lanzani",
Ospedali Riuniti di Bergamo

Introduzione

L'uso di cellule per ottenere un'azione terapeutica definisce una nuova categoria di medicinali: i prodotti per la terapia cellulare (PTC). Si intendono come PTC le preparazioni in cui la principale azione biologica è svolta da cellule o tessuti anche se in assenza di matrici o rivestimenti di natura organica od inorganica.

Esempi di questi prodotti sono: vaccini antitumorali, pelle coltivata in vitro, prodotti composti da parti strutturali e cellulari per la ricostruzione di ossa o cartilagini e altri ancora. Nell'ambito della terapia del paziente oncologico le terapie cellulari rientrano tra quei trattamenti che possono produrre un effetto anti-tumorale attraverso la attivazione diretta o indiretta dei meccanismi di difesa naturale, in generale attraverso la stimolazione delle difese immunologiche. Ai tentativi che utilizzano esclusivamente cellule del paziente stesso, prelevate, manipolate e quindi reinfuse si affiancano ulteriori pratiche che utilizzano cellule allogeniche da donatore HLA-compatibile con il ricevente. Il trapianto di midollo osseo nell'ambito del trattamento delle malattie emato-oncologiche è il simbolo più evidente della efficacia di questa applicazione clinica delle terapie cellulari.

Parallelamente al trapianto di midollo e di cellule staminali, così come all'infusione di leucociti da donatore (DLI, Donor Lymphocyte Infusions), vi sono anche altri esempi di terapia mediata da cellule che traducono le moderne acquisizioni immunologiche nella pratica clinica e che variano dall'uso di cellule dendritiche di varia maturazione a cellule NK e a varie popolazioni di linfociti T antigene specifici o policlonali. Più di recente sono stati prodotti dati scientifici sull'utilizzo di cellule CIK (Cytokine-Induced Killer Cells).

Premesse specifiche e risultati

Le CIK sono cellule linfoidi che possiedono caratteristiche fenotipiche intermedie tra cellule NK (CD56⁺) e linfociti T (CD3⁺), e che hanno mostrato la capacità di poter essere facilmente espanse in vitro in genere da 200 a 1000 volte in 14-

21 giorni di coltura (1-4) Secondo il protocollo standard di espansione di cellule CIK da sangue periferico, le cellule mononucleate estratte mediante centrifugazione su gradiente di Ficoll sono risospese alla concentrazione di 3×10^6 cell/ml in medium completo con aggiunta di 1000 U/ml di IFN α . Il giorno successivo si aggiunge il monoclonale anti CD3 OKT3 (50 ng/ml) e successivamente la coltura viene mantenuta in IL-2 (500 U/ml). Ogni 2-3 giorni la coltura è espansa con nuovo terreno fresco addizionato da IL-2. La crescita delle cellule CIK corrisponde al progressivo aumento della percentuale di cellule CD3+/CD56+ fino a valori massimi di 50%-60% della popolazione finale.

Le cellule CIK così ottenute mostrano una potente attività citotossica contro molte e differenti linee cellulari tumorali o campioni freschi di leucemia, incluse AML, CML e cellule di linfoma B e T (5-8). Il potere citolitico delle CIK è superiore a quello di cellule killer linfocitarie ottenute tramite stimolazione con sola IL-2 (cellule LAK) o a quello delle più studiate cellule NK.

In modelli animali, 5×10^6 - 4×10^7 cellule CIK murine proteggono da iniezioni di dosi letali di tumori singenici o allogenicici. Inoltre è anche stato dimostrato che cellule CIK umane proteggono animali SCID da dosi mortali di cellule primarie B di linfoma, CML, tumori solidi e diverse linee cellulari leucemiche umane (9-11).

In una prima fase di studio abbiamo controllato nel nostro laboratorio la capacità di crescere ed espandere in vitro cellule CIK a partenza dal sangue periferico di soggetti donatori sani e abbiamo confermato i dati della letteratura. In particolare in 21 giorni di coltura si possono ottenere fino a 1.5×10^9 cellule CIK in rigorose condizioni di produzione GMP (Good Manufacturing Practices). Successivamente all'approvazione del protocollo sperimentale da parte dell'Istituto Superiore di Sanità, abbiamo condotto una fase I sperimentale con cellule CIK da donatore sano per trattare ammalati ricaduti di malattia leucemica dopo il trapianto di midollo allogenico.

Brevemente, sono stati trattati 11 pazienti con leucemia mieloide acuta (4), linfoma di Hodgkin (3), leucemia mielomonocitica cronica (1), leucemia acuta linfoblastica (1) e 2 mielodisplasie tutti ricaduti dopo trapianto da familiare (6) o non correlato (5). Prima della somministrazione di cellule CIK 6 pazienti avevano ricevuto altri trattamenti di salvataggio incluse chemioterapia (5), radioterapia (1) o DLI non modificate (6) senza alcuna risposta significativa. Il numero mediano di infusione di cellule CIK era di 2 (range da 1 a 7) e il numero mediano di cellule infuse era di 12.4×10^6 /kg (range da 7.2 a 87.4). Le infusioni furono ben tollerate e non si registrò alcuna reazione acuta o tardiva correlabile con l'infusione. GVHD acuta di grado I-II fu osservata in 4 pazienti 30 giorni dopo l'ultima infusione di CIK, che in 2 casi progredì in GVH cronica estesa. In 6 pazienti si osservò progressione della malattia e morte. Furono osservate una malattia stabile, 2 miglioramenti ematologici e tre risposte complete. In conclusione di questa fase I concludemmo che la produzione di CIK allogeniche è fattibile in condizioni clinical-grade (GMP) e che la loro infusione è in generale sicura e che le cellule potrebbero contribuire ad una risposta clinica.

Accanto al trapianto di midollo osseo da donatore compatibile diviene sempre più diffusa la possibilità del trapianto da cordone ombelicale. Accanto agli innegabi-

Tab. 1 - Espansioni cellulari ottenute dai lavaggi da unità di sacche di sangue cordonale.

Sample	Total cells present in the CB unit bags		Total cells recovered after washout (day 0)			Total cells recovered at the end of the expansion protocol (day +21)		
	NC x106	CD3+ x106	A NC x106	B CD3+ x106	C CD3+/ CD56+ x106	A' NC x106	B' CD3+ x106	C' CD3+/ CD56+ x106
Wo #1	1700	790	12.0	3.7	0.4	474.0	444.0	378.0
Wo #2	468	89	30.0	2.8	0.6	695.0	690.0	507.0
Wo #3	1000	67	24.0	4.0	0.2	750.0	720.0	533.0
Mean±SD	1056 ±618	315.3 ±411	22 ±9	3.5 ±0.6	0.4 ±0.2	640 ±146	618 ±152	473 ±83
Fold Increase (range)						A'/A 31.3 (23-39)	B'/B 182 (120-246)	C'/C 1485 (845-2665)

li vantaggi della rapida disponibilità del campione e del basso rischio di GVHD scatenata da incompatibilità HLA tra donatore e ricevente, esistono tuttavia anche importanti svantaggi. Il primo è rappresentato dal maggior rischio, rispetto al tradizionale decorso da trapianto da midollo, di mancata o ritardata ricostituzione di neutrofili o piastrine, probabilmente dovuta alla disparità tra la taglia corporea della maggior parte dei pazienti adulti rispetto al numero di progenitori emopoietici presenti in una singola unità di sangue funicolare. Ma il maggior limite del trapianto da cordone si verifica nel caso di ricaduta leucemica, poichè la non reperibilità del donatore si traduce anche nell'impossibilità di disporre delle cellule linfoidi per un'eventuale infusione terapeutica (DLI).

Per ovviare a questo grave problema il nostro laboratorio si è domandato se, utilizzando una piccola frazione o solo il lavaggio dell'unità di sacca di sangue ombelicale dopo l'infusione, è possibile ottenere un numero di cellule CIK funzionalmente attive, sufficiente per ipotizzare una loro applicazione clinica come terapia cellulare specifica nella prevenzione e nel trattamento delle ricadute leucemiche in pazienti sottoposti a trapianto da cordone ombelicale.

Quest'idea si è concretizzata dimostrando come il semplice lavaggio della sacca di sangue cordonale al termine dell'infusione nel paziente è sufficiente all'ottenimento di un numero significativo di cellule CIK. In particolare nei tre casi mostrati nella tabella 1, pur partendo da un numero di cellule nucleate totali variabile da 12 a 30 x 106 (ovvero circa il 0.7%, 6.4% e 2.4 % della cellularità dei tre cordoni studiati), abbiamo ottenuto al termine della espansione, un numero mediano di 473 x 106 cellule CIK (range da 378 x 106 a 533 x 106).

Le cellule CIK così ottenute in 21 giorni di coltura possiedono un fenotipo sovrapponibile a quello tradizionale monitorabile attraverso l'aumento della percentuale di cellule CD3+/CD56+ inclusa l'alta espressione delle molecole NKG2D e Perforina sulla totalità delle cellule CIK, ovvero delle due molecole che si ritiene siano principalmente coinvolte nel meccanismo di citotossicità.

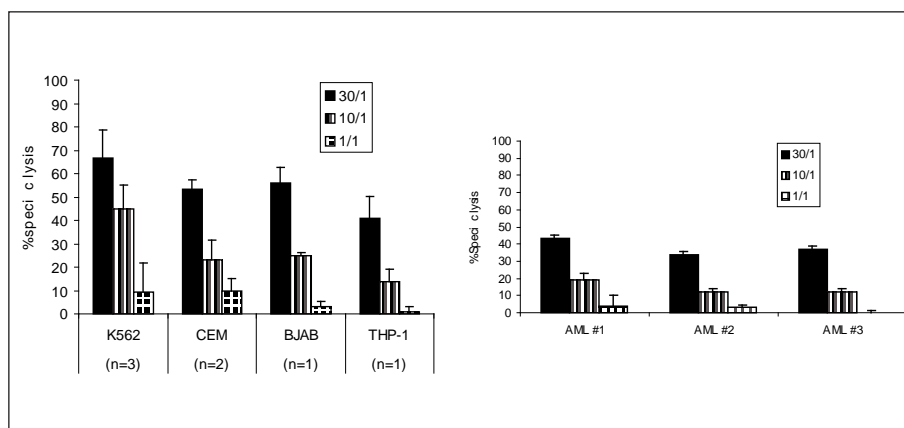


Fig. 1 - Analisi di citotossicità delle colture CIK contro linee cellulari K562, CEM, BJAB, TPH-1 e contro blasti AML isolati freschi.

Come mostrato nella Figura 1, le cellule CIK derivate dal cordone mostrano di essere in grado di uccidere entrambe i target leucemici mieloidi e T-linfoidi, oltre a blasti leucemici freschi AML. In particolare le CIK da lavaggio della sacca cordonale mostrano una forte attività citotossica contro K562, CEM, BJAB e THP-1 ai vari rapporti E:T studiati e sono citotossiche contro blasti freschi di AML: un tipico esempio è mostrato nella figura contro tre diversi bersagli tumorali (Figura 1).

Conclusioni

Questi nostri dati presentano per la prima volta l'idea che una infusione di salvataggio con cellule CIK può essere potenzialmente pianificata per pazienti che dovessero andare incontro a ricaduta leucemica dopo trapianto di cellule staminali cordonali. Abbiamo formalmente dimostrato che anche il semplice lavaggio della sacca cordonale effettuato dopo la somministrazione di cellule staminali al paziente può fornire un numero di CIK sufficienti a immaginare la fattibilità di queste somministrazioni. L'espansione delle cellule è avvenuta nel pieno rispetto delle norme GMP e secondo un protocollo approvato dalle autorità regolatorie.

Bibliografia

1. Lu PH., Negrin RS. A novel population of expanded human CD3+CD56+ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol* 1994; 153(4): 1687-96.
2. Hoyle C., Bangs CD., Chang P., Kamel O., Mehta B., Negrin RS. et al. Expansion of Philadelphia chromosome-negative CD3(+)/CD56(+) cytotoxic cells from chronic myeloid leukemia patients: in vitro and in vivo efficacy in severe combined immunodeficiency disease mice. *Blood* 1998; 92(9): 3318-27.

3. Alvarnas JC., Linn YC., Hope EG., Negrin RS. Expansion of cytotoxic CD3+ CD56+ cells from peripheral blood progenitor cells of patients undergoing autologous hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7(4): 216-22.
4. Schmidt-Wolf IG., Negrin RS., Kiem HP., Blume KG., Weissman IL. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. *J Exp Med* 1991; 174(1): 139-49.
5. Baker J., Verneris MR., Ito M., Shizuru JA., Negrin RS. Expansion of cytolytic CD8(+) natural killer T cells with limited capacity for graft-versus-host disease induction due to interferon gamma production. *Blood* 2001; 97(10): 2923-31.
6. Schmidt-Wolf IG., Lefterova P., Mehta BA., Fernandez LP., Huhn D., Blume KG. et al. Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor cell recognition of cytokine-induced killer cells. *Exp Hematol* 1993; 21(13): 1673-9.
7. Linn YC., Lau LC., Hui KM.. Generation of cytokine-induced killer cells from leukaemic samples with in vitro cytotoxicity against autologous and allogeneic leukaemic blasts. *Br J Haematol* 2002; 116(1): 78-86.
8. Sconocchia G., Lau M, Provenzano M., Rezvani K., Wongsena W., Fujiwara H. et al. The antileukemia effect of HLA-matched NK and NK-T cells in chronic myelogenous leukemia involves NKG2D-target-cell interactions. *Blood* 2005; 106(10): 3666-72.
9. Verneris MR., Ito M., Baker J., Arshi A., Negrin RS., Shizuru JA. et al. Engineering hematopoietic grafts: purified allogeneic hematopoietic stem cells plus expanded CD8+ NK-T cells in the treatment of lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7(10): 532-42.
10. Edinger M., Cao YA., Verneris MR., Bachmann MH., Contag CH., Negrin RS. et al. Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using in vivo bioluminescence imaging. *Blood* 2003;101(2): 640-8.
11. Sweeney TJ., Mailander V., Tucker AA., Olomu AB., Zhang W., Cao Y. et al. Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(21): 12044-9.

Immunoterapia cellulare adottiva con linfociti T citotossici

Rita Maccario

Laboratorio di Ricerca "Immunologia dei Trapianti", Oncoematologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Con il termine d'immunoterapia cellulare adottiva s'intende la somministrazione ad un individuo immunocompromesso di cellule immunocompetenti, ad esempio linfociti T specifici per un dato antigene, capaci di instaurare o ricostituire, nell'ospite, meccanismi d'immunosorveglianza nei confronti di patogeni o cellule neoplastiche. Le cellule utilizzabili per approcci d'immunoterapia cellulare adottiva possono essere derivate dall'individuo immunocompromesso stesso previo opportuno processo di manipolazione *in vitro* per l'acquisizione dello stato d'immunocompetenza verso l'antigene desiderato o, alternativamente, da un idoneo donatore allogenico immunocompetente.

Il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (CSE) può essere considerato il primo approccio d'immunoterapia cellulare adottiva, in quanto è stato utilizzato dalla fine degli anni '60 quale terapia risolutiva per bambini affetti da immunodeficienza primitiva grave (1). Negli anni successivi, la procedura è stata utilizzata con crescente successo per la cura di leucemie acute o croniche e altre forme di neoplasia, anche grazie all'effetto *graft-versus-tumor* esercitato dalle cellule immunocompetenti che, con il trapianto allogenico, sono trasferite insieme alle CSE (2-7). In ambito d'immunoterapia cellulare adottiva con cellule autologhe, i primi approcci sono stati sviluppati a partire dagli anni '80, soprattutto dai gruppi di Rosenberg e Greenberg (8-12).

A discapito degli ottimi risultati conseguiti con il trapianto allogenico di CSE, la procedura è ancora gravata da una percentuale d'insuccessi, in parte attribuibili a complicanze immunologiche, quali il rigetto e la malattia del trapianto contro l'ospite (*graft versus host disease*, GVHD), alla ricaduta neoplastica o al profondo stato d'immunodeficienza transitoria associata al trapianto che favorisce l'insorgenza di gravi infezioni opportunistiche. In particolare, gravi infezioni virali o fungine possono, con alta frequenza, colpire i pazienti sottoposti a trapianto allogenico di CSE purificate (CD34-positivo) da donatore HLA-parzialmente compatibile, poiché i riceventi questo tipo di trapianto non possono giovare del trasferimento da donatore a ricevente delle cellule immunocompetenti che, nel tra-

pianto convenzionale non manipolato da donatore HLA-compatibile, sono infuse al paziente ricevente insieme alle CSE.

I linfociti T, B e *natural killer* (NK), d'origine del donatore, proliferano e si differenziano nel ricevente di trapianto di CSE mediante due differenti percorsi, l'espansione periferica dei linfociti maturi trasferiti con l'espianto e la differenziazione di un nuovo sistema immunitario che deve percorrere tutte le tappe ontogenetiche necessarie alla differenziazione delle CSE in cellule effettrici della risposta immunitaria. Il processo di differenziazione di un nuovo sistema immunitario derivato dalle CSE del donatore è un processo più lento dell'espansione periferica dei linfociti maturi, è timo-dipendente per quanto riguarda i linfociti T, è capace di rigenerare un repertorio completo delle funzioni linfocitarie ed è responsabile della ricostituzione immunologica a lungo-termine dei pazienti sottoposti a trapianto di CSE. Il processo d'espansione periferica s'innesca nelle prime settimane dopo il trapianto, è responsabile della ricostituzione immunologica precoce e coinvolge, fra gli altri, i linfociti "alloreattivi", contenuti nell'espianto del donatore, che esprimono recettori capaci di riconoscere le cellule del ricevente poiché estranee (*non-self*). L'espansione periferica di linfociti T alloreattivi è responsabile dell'insorgenza e gravità della GVHD e deve, pertanto, essere controllata da terapie preventive immunosoppressive, nel caso di trapianto allogeneico di CSE non manipolato da donatore HLA-compatibile o da procedure di T- e B-deplezione dell'espianto, nel caso di trapianto da donatore solo parzialmente HLA-compatibile. Le strategie di prevenzione della GVHD, basandosi sulla soppressione della risposta immunitaria o sull'eliminazione dei linfociti T, B, ed NK indeboliscono inevitabilmente anche le difese immunologiche dirette contro i patogeni opportunisti e la recidiva di malattia neoplastica.

Il primo approccio d'immunoterapia cellulare adottiva in pazienti sottoposti a trapianto allogeneico di CSE è stato sviluppato agli inizi degli anni '90 dal gruppo di Seattle, guidato da Riddell e Greenberg (13), allo scopo di prevenire le gravi patologie correlate all'infezione post-trapianto da citomegalovirus (HCMV), soprattutto la polmonite interstiziale. L'approccio del gruppo di Seattle consisteva nella preparazione ed infusione, prima del manifestarsi della patologia, di cloni linfocitari T citotossici CD8+ HCMV-specifici per i pazienti incapaci di ricostituire precocemente, dopo il trapianto, la risposta immunologica virus-specifica. Per quanto i risultati ottenuti siano stati molto incoraggianti, solo recentemente altri gruppi hanno confermato l'utilità dell'approccio, sviluppando tecniche alternative di clonaggio, espansione ed infusione di linfociti T CD4+ HCMV-specifici o di linee policlonali composte di linfociti T sia CD4+ sia CD8+ (14, 15). I risultati più entusiasmanti in termini di prevenzione ed effetto terapeutico sono stati, tuttavia, ottenuti con l'immunoterapia cellulare adottiva delle infezioni da virus di Epstein-Barr (EBV). Una pietra miliare in questo specifico settore è rappresentata dagli studi del gruppo guidato da Rooney e Brenner, iniziati a metà degli anni '90 (16) che hanno dimostrato l'efficacia a lungo termine della terapia cellulare adottiva con linee linfoblastoidi T policlonali con attività citotossica EBV-specifica, sia per la prevenzione sia per la terapia della malattia linfoproliferativa post-trapianto (PTLD) EBV-correlata. Questi primi studi sono stati, in seguito, con-

fermati da altri gruppi e l'esperienza maturata in ambito di trapianto allogenico di CSE è stata estesa, al trattamento della PTLD EBV-correlata in pazienti sottoposti a trapianto d'organo solido (17, 18) e alla terapia d'altre neoplasie EBV correlate, ad esempio il carcinoma naso-faringeo, resistente alle terapie convenzionali (19). Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente descritto un'evoluzione del metodo di generazione *in vitro* dei linfociti T EBV-specifici per la propagazione di queste cellule anche nel caso di individui sieronegativi nei confronti del virus (generazione di risposta immunologia primaria, ref. 20). Quest'approccio metodologico potrebbe consentire la possibilità di terapia cellulare della PTLD, anche per i pazienti che ricevono il trapianto allogenico di CSE da un donatore EBV-sieronegativo. Recentemente l'approccio di terapia cellulare adottiva con cloni linfocitari T CD4+ è stato applicato anche alla prevenzione delle infezioni invasive da aspergillo (15). Le esperienze cliniche coronate da successo, sopra citate, hanno dato un notevole impulso alla ricerca in questo settore allo scopo di estendere gli approcci di terapia cellulare adottiva anche ad altri agenti infettivi opportunisti, quali adenovirus, varicella zoster, poliovirus BK che possono causare gravi complicanze, anche letali, ai pazienti immunocompromessi dalle procedure trapiantologiche e dai trattamenti immunosoppressivi cui sono sottoposti i pazienti trapiantati per prevenire e/o controllare rigetto e GVHD (21).

Per i pazienti con leucemia, primo obiettivo del trapianto allogenico di CSE è la sostituzione di un sistema emopoietico malato e danneggiato in modo irreversibile dalla radio/chemioterapia con quello sano d'origine del donatore. Una consolidata esperienza clinica ha, tuttavia, dimostrato che il trapianto allogenico di CSE svolge un'importantissima azione d'immunosorveglianza antineoplastica, descritta come "effetto del trapianto contro la leucemia" (*graft versus leukaemia*, GVL). L'effetto GVL è mediato, prevalentemente, dai linfociti T e NK, d'origine del donatore, dotati di specificità "alloreattiva" e capaci, quindi, di eliminare, le cellule leucemiche del paziente (21, 22). La maggior parte dell'effetto GVL è strettamente connessa con la reazione del trapianto contro l'ospite (*graft versus host reaction*, GVHR) e con la GVHD, quest'ultima mediata prevalentemente dai linfociti T. Nei casi in cui l'effetto GVL innescato dal trapianto allogenico non sia sufficiente ad eliminare la malattia neoplastica, una delle possibili strategie d'intervento utili a prevenire o curare la recidiva leucemica consiste nell'infusione ritardata di linfociti del sangue periferico (*delayed lymphocyte infusion*, DLI) del donatore di CSE, applicata allo scopo di innescare, a distanza di tempo dal trapianto, una GVHR che aiuti ad eliminare le cellule neoplastiche. La DLI è particolarmente efficace per la terapia della ricaduta dopo trapianto in caso di leucemia mieloide cronica, ma il suo effetto antileucemico è significativamente inferiore in caso di leucemia acuta o di sindrome mielodisplastica; inoltre, questa forma di terapia cellulare è gravata da un considerevole rischio di innescare GVHD grave, talvolta difficilmente controllabile (23).

Il fondamento logico dell'uso, per i pazienti sottoposti a trapianto allogenico di CSE, di protocolli d'immunoterapia cellulare adottiva con linfociti T capaci, a differenza della DLI, di aggredire selettivamente solo le cellule leucemiche poggia sulla dimostrazione dell'efficacia, in assenza d'effetti collaterali rilevanti,

della terapia cellulare adottiva, virus-specifica, soprattutto nella prevenzione e cura di PTLD EBV-correlate. In entrambi i casi, le cellule potenzialmente utilizzabili per generare ed espandere linee linfocitarie T policlonali, o derivate da singoli cloni linfocitari T, sono d'origine del donatore di trapianto di CSE e derivano, quindi, da un individuo immunocompetente in grado di sviluppare un repertorio immunologico completo ed efficiente. Nel caso di terapia cellulare adottiva antivirale, numerose esperienze cliniche hanno dimostrato come le cellule trasfuse abbiano la possibilità d'incontrare numerosi antigeni virali immunodominanti, capaci di stimolare una considerevole espansione numerica dei linfociti T virus-specifici e di favorire lo sviluppo di memoria immunologica, utile al controllo delle eventuali successive riattivazioni del virus stesso. Nel caso di terapia cellulare adottiva antitumorale, la possibilità di successo è moderata dall'evidenza dei numerosi potenziali meccanismi con cui la cellula tumorale potrebbe, anziché attivare, bloccare la risposta immunitaria antineoplastica trasferita (*immune escape*). Il vantaggio della terapia cellulare adottiva, rispetto alla DLI potrebbe tuttavia derivare, oltre che da un rischio ridotto di sviluppo di GVHD grave, anche dal fatto che nel primo caso la risposta antitumorale può essere indotta, espansa e potenziata *ex-vivo*, evitando così la parte di meccanismi d'*immune escape* che agiscono inibendo la fase d'induzione ed espansione dei linfociti T antileucemia. Le linee policlonali o monoclonali di linfociti T, idonee per terapia cellulare adottiva, devono possedere una serie di requisiti indispensabili per garantire la sicurezza ed efficacia del loro impiego *in vivo*. Idealmente, i requisiti necessari comprendono:

- 1) capacità di uccidere selettivamente o, almeno, in modo nettamente preferenziale le cellule leucemiche e, di conseguenza, scarsa capacità d'aggregare le cellule sane del paziente;
- 2) capacità di espandersi rapidamente *in vitro* e, possibilmente, *in vivo* mantenendo inalterate le loro caratteristiche di funzione e specificità;
- 3) capacità di raggiungere i siti dell'organismo dove sono in fase d'espansione le cellule leucemiche;
- 4) capacità di differenziare e mantenere cellule della memoria immunologica che garantiscano immunosorveglianza antileucemica a lungo termine.

La prima scelta strategica, utile per impostare un programma di terapia cellulare adottiva antileucemia riguarda il tipo d'antigene utilizzato per la generazione sia di linfociti T citotossici (CTL) antileucemia che d'altre sottopopolazioni linfocitarie T, necessarie per l'espansione dei CTL. Almeno tre categorie d'antigeni sono state analizzate per esplorare la loro potenzialità d'indurre *in vitro* una risposta immunitaria antileucemia mediata da linfociti T, impiegabile in approcci d'immunoterapia cellulare adottiva per pazienti sottoposti ad allo-TCSE:

- 1) antigeni tumore-specifici non-polimorfici;
- 2) antigeni minori polimorfici (mHAg);
- 3) antigeni non-polimorfici di differenziazione cellulare iperespressi sulle cellule tumorali.

Una scelta strategica, alternativa a quelle sopra menzionate, è l'utilizzo delle cellule leucemiche, rese apoptotiche mediante irradiazione, quale fonte d'antigene

tumorale per la generazione di CTL antileucemia, originati dalle cellule mononucleate del donatore di trapianto allogenico di CSE. Nel 1999 Falkenburg et al. (24) hanno descritto, utilizzando quest'approccio, la prima esperienza di terapia cellulare adottiva antileucemia in una paziente con leucemia mieloide cronica, in fase accelerata di malattia dopo trapianto e resistente a DLI; lo studio ha dimostrato la possibilità di ottenere, mediante l'infusione di un ragguardevole numero di cellule coltivate *in vitro*, uno stato di remissione ematologica completa dopo infusione di linee policlonali di CTL antileucemia, derivate dal sangue periferico del donatore mediante stimolazione *in vitro* con blasti leucemici apoptotici del paziente e interleuchina-2 (IL-2).

Questo risultato rappresenta una pietra miliare per la sperimentazione di un simile approccio di terapia cellulare adottiva, anche per pazienti affetti da leucemia acuta. Inoltre, studi del nostro gruppo hanno dimostrato come lo sviluppo d'immunosorveglianza anti-leucemia correli con il mantenimento di uno stato di remissione della malattia neoplastica nei pazienti sottoposti a trapianto sia allogenico che autologo di CSE (25, 26).

Studi successivi si sono, perciò, focalizzati sull'ottimizzazione di metodologie che consentissero di espandere efficientemente *in vitro* CTL capaci di mantenere attività antileucemia anche dopo parecchi cicli di ristimolazione. In particolare un interessante protocollo metodologico ottimizzato e recentemente descritto da Montagna e coll. (27-29) utilizza:

- 1) cellule dendritiche - le *antigen presenting cells* professioniste - d'origine del donatore;
- 2) blasti leucemici del paziente trapiantato, resi apoptotici mediante irradiazione, quale fonte d'antigeni tumorali;
- 3) popolazioni arricchite in linfociti CD8-positivi d'origine del donatore quali cellule effettrici dell'attività citotossica antileucemia;
- 4) aggiunta, ad opportuni tempi di coltura, di cellule *feeder* e (cellule mononucleate del donatore, privedute di linfociti CD8-positivi) irradiate di citochine (IL-7, IL-12, IL-2) importanti per l'induzione ed espansione a lungo-termine dei CTL.

Un ulteriore approfondimento nel processo di ottimizzazione di questo approccio metodologico ha consentito di dimostrare che, mediante l'utilizzo di opportune tecniche di clonaggio e propagazione di linee linfocitarie T, derivate da una singola cellula, è possibile separare *in vitro* i linfociti T capaci di aggredire selettivamente la cellula neoplastica (effetto GVL) da quelli potenzialmente in grado di indurre la GVHD (30).

I risultati fino ad ora ottenuti *in vitro*, hanno dimostrano come la strategia metodologica d'utilizzo di blasti leucemici apoptotici, presentati da cellule dendritiche del donatore di trapianto allogenico di CSE indipendentemente dal suo fenotipo HLA, non richieda la definizione di uno specifico antigene tumorale e consenta di generare, dalle cellule mononucleate del donatore stesso, linee linfocitarie T antileucemia policlonali capaci di espandersi per parecchi cicli replicativi senza perdere le caratteristiche intrinseche di specificità e funzionalità. L'uso della cellula tumorale apoptotica quale fonte di antigeni tumorali, presentati presumibil-

mente con un meccanismo di *cross-priming* dalle cellule dendritiche, non permette, d'altro canto, di definire la natura degli antigeni riconosciuti dai CTL antileucemia che potrebbero comprendere proteine tumore-specifiche, mHAg e antigeni non-polimorfici di differenziazione cellulare iperespressi sulle cellule tumorali. La policlonalità della risposta evocata rappresenta, tuttavia, anche in assenza della definizione precisa degli antigeni riconosciuti dai CTL antileucemia, un vantaggio considerevole in termini di potenziale efficacia dei CTL antileucemia *in vivo* poiché diminuisce la possibilità che la risposta T citotossica possa essere bloccata da meccanismi d'*immune escape*. L'insieme di queste osservazioni rappresenta un'importante base biologica per la programmazione di protocolli d'immunoterapia cellulare adottiva, basati sull'uso di CTL antileucemia per il controllo della malattia residua minima e per la prevenzione della recidiva, in pazienti oncoematologici sottoposti a trapianto allogenico di CSE.

Bibliografia

1. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature*. 2001; 411: 385-389.
2. Good RA. Bone marrow transplantation for immunodeficiency diseases. *Am J Med Sci*. 1987; 294: 68-74.
3. Treleaven J., Barrett J. Bone Marrow Transplantation in Practice. Churchill Livingstone, Edinburgh. 1992; 399.
4. Appelbaum FR. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemia. *Semin Oncol*. 1997; 24: 114-123.
5. Locatelli F., Burgio GR. Transplant of hematopoietic stem cells in childhood: where we are and where we are going. *Haematologica*. 1998; 83: 550-563.
6. Arcese W., Aversa F., Bandini G., De Vincentiis A., Falda M., Lanata L., Lemoli RM., Locatelli F., Majolino I., Zanon P., Tura S. Clinical use of allogeneic hematopoietic stem cells from sources other than bone marrow. *Haematologica*. 1998; 83: 159-82.
7. Gluckman E, Locatelli F. Umbilical cord blood transplants. *Curr. Opin. Hematol*. 2000; 7: 353-357.
8. Kawakami Y., Nishimura MI, Restifo NP., Topalian SL., O'Neil BH., Shilyansky J., Yannelli JR., Rosenberg SA. T-cell recognition of human melanoma antigens (Review). *J Immunother*. 1993; 14: 88-93.
9. Wang RF., Rosenberg SA. Human tumor antigens for cancer vaccine development. *Immunol Rev*. 1999; 170: 85-100.
10. Rosenberg SA., Dudley ME. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101 Suppl 2: 14639-45.
11. Yee C., Thompson JA., Byrd D., Riddell SR., Roche P., Celis E., Greenberg PD. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: *in vivo* persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 16168-73.

12. Blattman JN., Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science*. 2004; 305: 200-5.
13. Riddell SR., Greenberg PD. Principles for adoptive T cell therapy of human viral disease. *Annu Rev Immunol*. 1995; 13: 545-586.
14. Einsele H., Roosnek E., Rufer N., Sinzger C., Riegler S., Loffler J., Grigoleit U., Moris A., Rammensee HG., Kanz L., Kleihauer A. Frank F., Jahn G., Hebart H. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood*. 2002; 99: 3916-3922.
15. Perruccio K., Tosti A., Burchielli E., Topini F., Ruggeri L., Carotti A., Capanni M., Urbani E., Mancusi A., Aversa F., Martelli MF., Romani L., Velardi A. Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Blood*. 2005; 106: 4397-4406.
16. Heslop HE., Rooney CM. Adoptive cellular immunotherapy for EBV lymphoproliferative disease. *Immunol Rev*. 1997; 157: 217-22.
17. Comoli P., Labirio M., Basso S., et al. Infusion of autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for prevention of EBV-related lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients with evidence of active virus replication. *Blood* 2002; 99: 2592-2598.
18. Comoli P, Maccario R, Locatelli F, Valente U, Basso S, Garaventa A, Toma P, Botti G, Melioli G., Baldanti F., Nocera A., Perfumo F., Ginevri F. Treatment of EBV-related post-renal transplant lymphoproliferative disease with a tailored regimen including EBV-specific T cells. *Am J Transplant*. 2005; 5: 1415-1422.
19. Comoli P, Pedrazzoli P, Maccario R., Basso S., Carminati O., Labirio M., Schiavo R., Secondino S., Frasson C., Perotti C., Moroni M., Locatelli F., Siena S. Cell Therapy of Stage IV Nasopharyngeal Carcinoma With Autologous Epstein-Barr Virus-Targeted Cytotoxic T Lymphocytes. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 8942-9.
20. Comoli P, Ginevri F, Maccario R. Frasson C., Valente U., Basso S., Labirio M., Huang GC., Verrina E, Baldanti F, Perfumo F, Locatelli F. Successful in vitro priming of EBV-specific CD8+ T cells endowed with strong cytotoxic function from T cells of EBV-seronegative children. *Am J Transplant*. 2006; 6: 2169-76.
21. Locatelli F., Comoli P., Montagna D., Rossi F., Dautt L. Maccario R. Innovative approaches of adoptive immune cell therapy in paediatric recipients of haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2004; 17: 479-92
22. Velardi A., Ruggeri L., Moretta A. Moretta L. NK cells: a lesson from mismatched haemopoietic transplantation. *Trends Immunol*. 2002; 23: 438-444.
23. Kolb HJ., Schmid C., Barrett AJ., Schendel DJ.. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood* 2004; 103: 767-76.
24. Falkenburg JH., Wafelman AR., Joosten P., Smit WM., van Bergen CA., Bongaerts R., Lurvink E., van der Hoorn M, Kluck P, Landegent JE, Kluin-

- Nelemans HC, Fibbe WE, Willemze R. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood*. 1999; 94: 1201-1208.
25. Montagna D., Locatelli F., Calcaterra V., Comoli P., Moretta A., Giorgiani G., Zecca M., Bonetti F., Giraldi E., Rondini G., Maccario R. Does the emergence and persistence of donor-derived leukaemia-reactive T lymphocytes protect patients given an allogeneic BMT from recurrence? Results of a preliminary study. *Bone Marrow Transplant*. 1998; 22: 743-750.
 26. Montagna D., Maccario R., Locatelli F., Montini E., Pagani S., Bonetti F., Daudt L., Turin I., Lisini D., Garavaglia C., Dellabona P., Casorati G. Emergence of antitumor cytolytic T cells is associated with maintenance of hematologic remission in children with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006; 108: 3843-50.
 27. Montagna D., Yvon E., Calcaterra V., Comoli P., Locatelli F., Maccario R., Fisher A., Cavazzana-Calvo M. Depletion of alloreactive T cells by a specific anti-interleukin-2 receptor p55 chain immunotoxin does not impair in vitro antileukemia and antiviral activity. *Blood* 1999; 93: 3550-3557.
 28. Montagna D., Maccario R., Locatelli F., Rosti V., Yang Y., Farness P., Moretta A., Comoli P., Montini E., Vitiello A. Ex vivo priming for long-term maintenance of antileukemia human cytotoxic T cells suggests a general procedure for adoptive immunotherapy. *Blood* 2001; 98: 3359-3366.
 29. Montagna D., Maccario R., Montini E., Tonelli R., Lisini D., Pagani S., Comoli P., Montagna D., Maccario R., Montini E., Tonelli R., Lisini D., Pagani S., Comoli P., Moretta A., Assirelli E., Basso S., Vitiello A., Pession A., Locatelli F. Generation and ex vivo expansion of cytotoxic T lymphocytes directed toward different types of leukemia or myelodysplastic cells using both HLA-matched and partially matched donors. *Exp Hematol*. 2003; 31: 1031-8.
 30. Montagna D., Daudt L., Locatelli F., Montini E., Turin I., Lisini D., Giorgiani G., Bernardo ME., Maccario R. Single-cell cloning of human, donor-derived antileukemia T-cell lines for in vitro separation of graft-versus-leukemia effect from graft-versus-host reaction. *Cancer Res*. 2006; 66: 7310-6.

**CELLULE STAMINALI
E MEDICINA RIGENERATIVA**

Mobilization of bone marrow-derived hematopoietic and endothelial stem cells after liver injury

Roberto M. Lemoli

Institute of Hematology and Medical Oncology "L. & A. Seràgnoli" and Center for Stem Cell Research, University of Bologna, S.Orsola-Malpighi Hospital, Bologna

At least two resident cell populations have been shown to act as putative stem cells (SC) in the liver (1). Whereas moderate cell loss is replaced by the proliferation of mature hepatocytes, more severe liver injury induces the activation of a "facultative" SC compartment located within the smallest branches of the intrahepatic biliary tree, the so-called "oval cells" which give origin to hepatocytes and the bile duct epithelium. Interestingly, liver oval SC share the CD34 and c-kit antigens with hematopoietic stem/progenitor cells (2).

Recently, a third source of liver-repopulating cells has proven to be the bone marrow (BM) as animal studies have shown that BM cells contribute, at low levels, to liver regeneration after tissue injury (3-7).

In humans, results from gender mismatch liver transplantation studies demonstrated that BM-derived cells of host origin can differentiate into hepatocytes and cholangiocytes in transplanted livers (8, 9) although the mechanism by which hematopoietic stem cells (HSCs) acquire the function of mature hepatocytes (i.e. cell fusion or true trans-differentiation) is still debated (10-13). Of note, different cellular types from the BM or the peripheral blood (PB) (14) of hematopoietic (3, 4, 7, 15-17) and non-hematopoietic origin (18,19) share the capacity to generate liver cells *in vitro* and *in vivo*. Therefore, the BM is generally regarded as a novel source of liver-repopulating cells that can be exploited for therapeutic purposes (20, 21).

The potential of human CD34⁺ HSCs to migrate to the liver in response to stress signals to repair non-hematopoietic tissue has been recently established in nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) mice (22). In this model, stress-induced signals, such as increased expression of the chemokine stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), stem cell factor (SCF) and hepatocyte growth factor (HGF) were able to recruit to the liver human CD34⁺ HSCs with hepatic-like potential. Similarly, acute and chronic liver injury models were generated by injecting carbon tetrachloride (CCl₄) in C57Bl6 mice fol-

lowed by HSC mobilizing doses of the hematopoietic cytokine granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) (23). In both experimental models, G-CSF administration improved the histological damage and accelerated the regeneration process. These findings translated into a strong survival benefit in G-CSF-treated group *versus* CCl₄ group. Thus, G-CSF treatment significantly improved the liver histology of chemically injured mice by promoting endogenous repair mechanisms and by mobilizing HSCs.

Despite extensive investigations in animal models of liver injury (21), no information is presently available on the mechanisms and kinetics of mobilization of BM SC after liver damage in humans.

Recently, it has been shown that partial hepatectomy in living liver donors induces the mobilization of BM-derived myelomonocytic progenitor cells with hepatic differentiation potential *in vitro* that may play a role in liver regeneration (24).

In this investigation, we studied the early response of BM-derived SC of patients undergoing orthotopic liver transplantation (OLT) or liver resection.

Our phenotypic, functional and molecular studies demonstrated:

- 1) the significant, physiologic mobilization of host-derived hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells after tissue injury;
- 2) this finding was associated with increased serum levels of cytokines involved in SC mobilization and/or liver repair;
- 3) ischemia/reperfusion organ damage associated with OLT is a more efficient stimulus to SC mobilization than massive liver resection.

Materials and methods

Patients and control group

We assessed the peripheral blood (PB) stem/progenitor cells compartment of 24 and 13 adult patients undergoing OLT and liver resection, respectively. The clinical characteristics of study patients are reported in Table 1. Blood samples were taken one day before (day -1) and then one, three, seven and fourteen days after surgery when possible. Single samples from 12 healthy subjects served as controls.

Flow Cytometry Analysis

The phenotype of circulating cells was evaluated by conventional dual color immunofluorescence using a panel of fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated and phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibodies (MoAbs): FITC-conjugated anti-CD34, PE-conjugated anti-CD38, PE-conjugated anti-CXCR4, PE-conjugated anti-CD90 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). PE-conjugated anti-CD133 was purchased from Miltenyi Biotec (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). MoAbs against VEGFR-2 (KDR) (clone KDR-1), VEGFR-1 (Flt-1 receptor) (clone FLT-19) (Sigma, Saint Louis, MI, USA) antigens were tested by indirect immunofluorescence. Negative controls were isotype-matched irrelevant MoAbs (Becton Dickinson).

Tab. 1 - Characteristics of patients.

Transplanted patients (N°)	24
Age (years)	57 (38-67)
Sex (Male/Female)	18/6
Diagnosis:	
HCV	16 (66%)
HBV	4 (17%)
Alcoholic liver disease	4 (17%)
Hepatocellular carcinoma	14 (58%)
Child-Pugh class:	
A	1 (4%)
B	11 (46%)
C	12 (50%)
Cold ischemia time (minutes)	427 (175-835)
Anhepatic phase time (minutes)	70 (46-135)
Resected patients (N°)	13
Age (years)	55 (20-80)
Sex (Male/Female)	2/11
Diagnosis:	
Hepatocellular carcinoma	3 (23%)
Gallbladder and bile duct cancer	4 (30%)
Metastatic colon/kidney cancer	3 (23%)
Bile duct adenoma	1 (13%)
Right lobe rupture	1 (13%)
Right lobe angioma	1 (13%)
Percentage of resected liver:	
Right hepatectomy	55%
Left hepatectomy	40%
Left lobectomy	30%
Resection of segment 6	15%
Surgery:	
Right hepatectomy	7/13
Left hepatectomy	3/13
Left lobectomy	1/13
Resection of segment 6	1/13

Data are expressed as median (range); N°=number

Hematopoietic Colony-Forming Unit Cells (CFU-C) assays

Assessment of clonogenic hematopoietic progenitors was performed in methylcellulose as previously reported (25, 26).

Cell preparation and HSC purification

Enriched MNC were resuspended in 1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma) and then processed by MiniMacs high-gradient magnetic separation column (Miltenyi Biotec) to obtain highly purified CD34⁺ cells as already reported (25, 26). The percentage of CD34⁺ cells after magnetic separation was 93±6%.

Fluorescence-in situ-hybridization (FISH) and Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Both FISH and RT-PCR assays were performed on immunomagnetically highly purified CD34⁺ cells. The slides were prepared immediately before hybridization. We used two probes: CEP X that hybridizes to centromere region Xp11.1-q11.1

(Spectrum Orange, Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA) and CEP Y to chromosome band Yq13 (satellite III, Spectrum Green, Vysis Inc.). The normal female pattern was 2 red signals and the normal male pattern was 1 red and 1 green signal. Two hundred and ten CD34⁺ HSC were analyzed.

The expression of cytokeratin (CK)-19 and α -fetoprotein (AFP) transcripts was assessed by RT-PCR amplification using gene specific primers (CK-19; F: 5'-atg-gccgagcagaaccgga-3', R: 5'-ccatgagccgtcgtactcc-3'; AFP; F: 5'-tgcagccaaagt-gaagagggaaga-3', R: 5'-catagcagcagcccaagaaga-3') (19).

Cytokine measurements

The serum levels of study cytokines was measured before OLT or liver resection and on days 1, 7 and 14 after surgery by high-sensitivity ELISA assays. SCF, G-CSF, HGF, SDF-1, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) kits were from R&D Systems (Wiesbaden, Germany). Interleukin (IL)-6 kit was from Biosource International (Camarillo, CA, USA).

Statistical analysis

The data were analyzed by the Wilcoxon test for paired data, Mann-Whitney test and by the Fisher's exact test. Spearman rank correlation test was used for correlation analysis. A p value <0.05 was considered statistically significant. Data processing was carried out with the SPSS statistical package for Windows (11.0.1).

Results

OLT patients mobilize hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells

At baseline, patients with liver disease showed decreased hematopoietic function as demonstrated by the significant lower concentration of PB CD133⁺, CD34⁺ SC and CFU-C than in healthy donors (Fig. 1).

Nonetheless, the longitudinal phenotypic evaluation of circulating cells after OLT demonstrated the small, but significant, early mobilization of CD34⁺ HSCs (Figure 2A) which remained higher than the baseline value until day +14 (p=0.041) and returned to pretreatment levels on day +30 after OLT (data not shown). In keeping with the spontaneous mobilization of CD34⁺ cells, we observed a significantly higher number of circulating CFU-C on day +14 after transplantation (Figure 2A). The number of CFU-C was higher than the baseline value when the results were expressed both as number of colonies/10⁶ MNC and colonies/PB microliter. Thus, we ruled out any confounding effect due to the possible increase of the white blood cells count after OLT.

When we analyzed selected subsets of the CD34⁺ HSC population, we found the significant increase of very immature CD34⁺/CD90⁺ cells and CD34⁺ cells coexpressing the chemokine SDF-1 receptor CXCR4 (from day +3 to +14; p<0.05) (Figure 2A).

Also the concentration of multipotent PB CD133⁺ stem/progenitor cells and endothelial CD34⁺/VEGFR-2 (KDR)⁺ progenitors (Figure 2A) augmented fol-

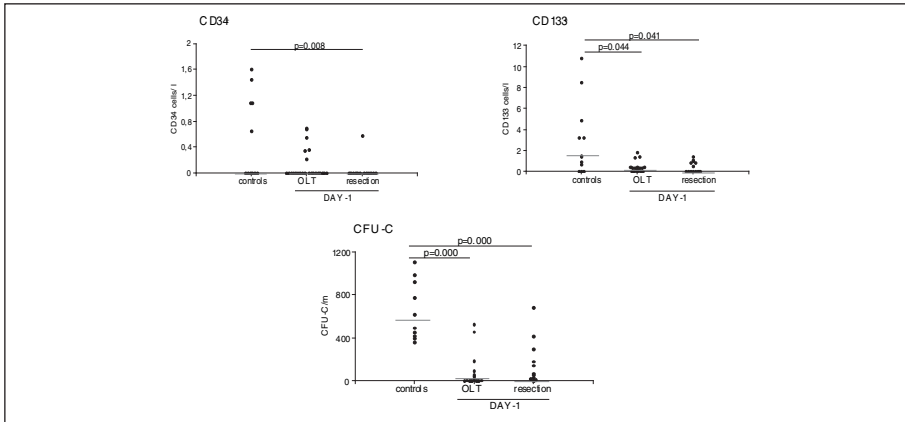


Fig. 1 - Impaired BM function in patients with liver disease. Circulating BM-derived cells were evaluated by phenotypic analysis and clonogenic assay. Baseline concentrations of CD34+, CD133+cells, and CFU-C were significantly lower in patients undergoing liver resection and OLT, respectively, than in healthy controls. The bold line indicates the median value.

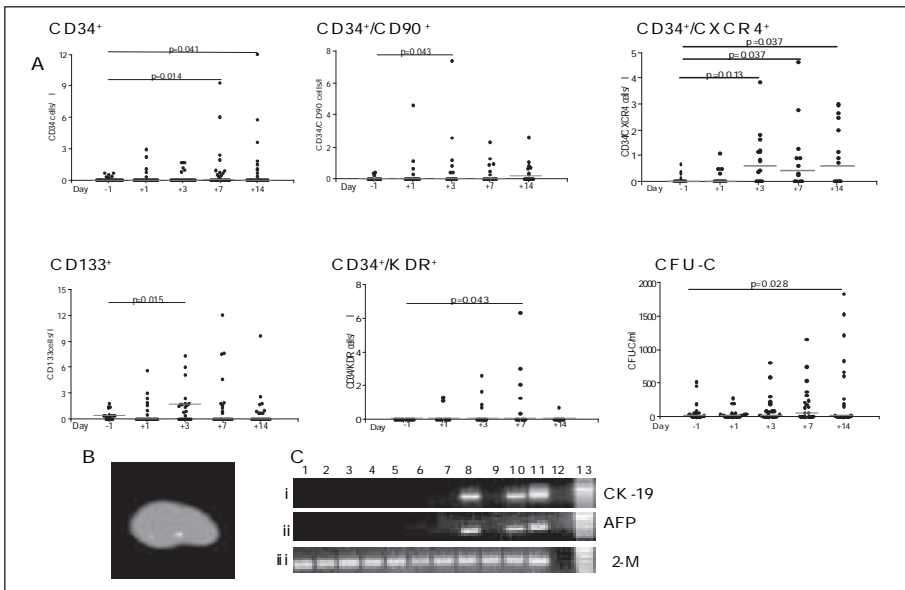


Fig. 2A - Phenotypic and functional analysis of PB cells before and after OLT demonstrates the mobilization of BM-derived stem/progenitor cells. Following OLT, we observed the significant early increase of hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells and the mobilization of CFU-C on day +14. The bold line indicates the median value. **B**. OLT induces the mobilization of host-derived HSCs co-expressing mRNA for liver-specific epithelial markers. FISH analysis was performed on purified circulating CD34+ cells from a male recipient of a female-derived liver and no female cells (XX, orange/orange pattern) were observed. **(C)**. CK-19 (i) and AFP (ii) transcripts were assessed in circulating CD34+ cells by RT-PCR. Lanes 1,2: PB MNC from mobilized healthy donors; lanes 3,5 baseline samples from two non mobilizers OLT patients; lanes 4,6 day +7 post-OLT samples from the same non mobilizers; lanes 7,9 baseline samples from two mobilizers OLT patients; lanes 8,10 day +7 post-OLT samples from the same mobilizers; lane 11 positive control (human liver); lane 12: negative control (no cDNA); lane 13 molecular weight markers.

lowing OLT reaching the statistical significance ($p < 0.05$) at days +3 and +7 after surgery, respectively, and returning to baseline levels on day +14. Interestingly, the cold ischemia time of the liver transplant (Table 1) directly correlated with the number of circulating CD133⁺ cells at day +3 after OLT ($r = 0.5$; $p = 0.01$).

Mobilized CD34⁺ SC are of host origin and co-express mRNAs for epithelial liver-specific markers.

In a representative case of sex-mismatch transplant, circulating CD34⁺ cells from a male recipient of a female-derived liver, were purified and analyzed by FISH (Figure 2B). Two hundred and ten cells were analyzed and no female cells (XX, orange/orange pattern) were observed. This result demonstrated the host origin of circulating CD34⁺ cells and ruled out that the observed increase of PB HSCs may be due to hematopoietic cells carried over by the transplanted liver (27).

Moreover, RT-PCR assay showed that circulating CD34⁺ cells analyzed after OLT, but not baseline steady-state cells from the same patients or PB samples from G-CSF-mobilized healthy donors, expressed mRNA for CK-19 and AFP hepatocyte markers (Fig. 2C). Therefore, we demonstrated that OLT induces the release from the BM of HSCs co-expressing epithelial markers.

SC mobilization in patients undergoing liver resection

Thirteen patients, mostly with primary or metastatic liver cancer (Table 1), who were submitted to liver resection were also studied to answer the question of whether the surgical procedure, *per se*, induces SC mobilization and whether the removal of a large part of the liver (up to 55%) represents an efficient stimulus to recruit BM cells into PB.

Similarly to OLT patients, resected individuals showed impaired BM function as demonstrated by the significantly reduced number of circulating CD34⁺, CD133⁺ cells and CFU-C at baseline (Figure 1). The longitudinal study performed after surgery showed only the significant mobilization of total CD34⁺ cells at day +3 after surgery (Figure 3). The extent and the length of mobilization of CD34⁺ cells after liver resection was markedly lower than after OLT. PB endothelial stem/progenitor cells as well as selected subsets of HSCs did not increase in response to liver resection even after removal of 55% of the organ (data not shown).

SC mobilization is associated with increased serum levels of selected cytokines

When we analyzed the serum level of cytokines involved in SC mobilization and/or liver repair, we found that the baseline levels of IL-6 and HGF were significantly higher, and VEGF levels lower, in patients undergoing OLT than in healthy controls (Figure 4).

In liver resected patients, HGF and SCF serum concentrations were significantly higher and lower, respectively, than in control samples (Figure 4). No difference was found as for SDF-1, G-CSF and TNF- α (data not shown). In parallel with mobilization of BM-derived SC, after OLT, we observed the significant increase of SCF (day +7), G-CSF (day +1), IL-6 (day +7) and VEGF (day +7 and +14) (Figure 5) but not of HGF and TNF- α (data not shown). Of note, the serum level

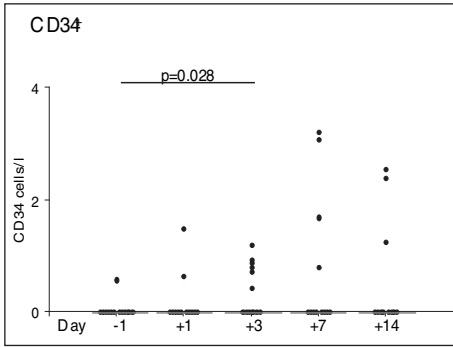


Fig. 3 - Liver resection induces the mobilization of CD34+ HSCs. The phenotype of PB cells of resected patients was evaluated by conventional immunofluorescence. Following liver resection we observed the early mobilization of total CD34+ at day +3. The bold line indicates the median value.

of the hematopoietic and mobilizing cytokine G-CSF peaked at day +1 after OLT and returned to baseline levels at day +7 (Figure 5). The serum level of SDF-1 significantly decreased early after transplantation (Figure 5) and this finding may be consistent with the proteolytic degradation of this chemokine in the BM inducing the release of HSCs into PB (28). Conversely, SDF-1 may be highly expressed at the injury site to recruit circulating CD34+ cells (22).

When serum cytokine levels were analyzed in patients undergoing liver resection, we found the significant increase of SCF, IL-6, VEGF, HGF and G-CSF (Figure

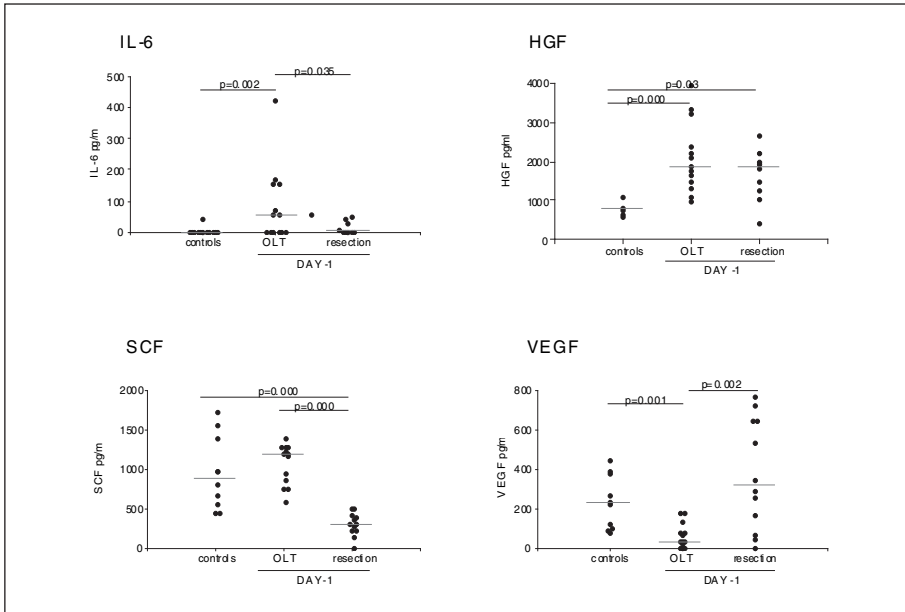


Fig. 4 - Baseline serum levels of study cytokines. The baseline levels of IL-6 and HGF were significantly higher, and VEGF levels lower, in patients undergoing OLT than in healthy controls. In liver resected patients, HGF and SCF serum concentrations were significantly higher and lower, respectively, than in control samples. The bold line indicates the median value.

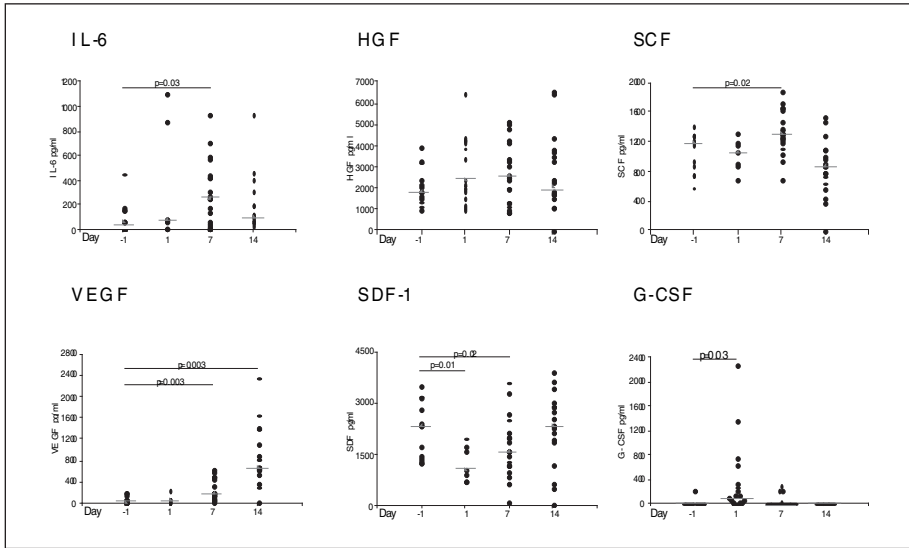


Fig. 5 - OLT induces increased serum levels of multiple cytokines. After liver transplantation, we observed the significant increase of IL-6, SCF, VEGF and G-CSF but not of HGF. The serum level of SDF-1 significantly decreased at days +1 and +7 after transplantation. The bold line indicates the median value.

6). Of note, the serum level of SCF was remarkably higher after OLT than after liver resection. Again, G-CSF peaked at day +1 and rapidly decreased to pre-treatment levels.

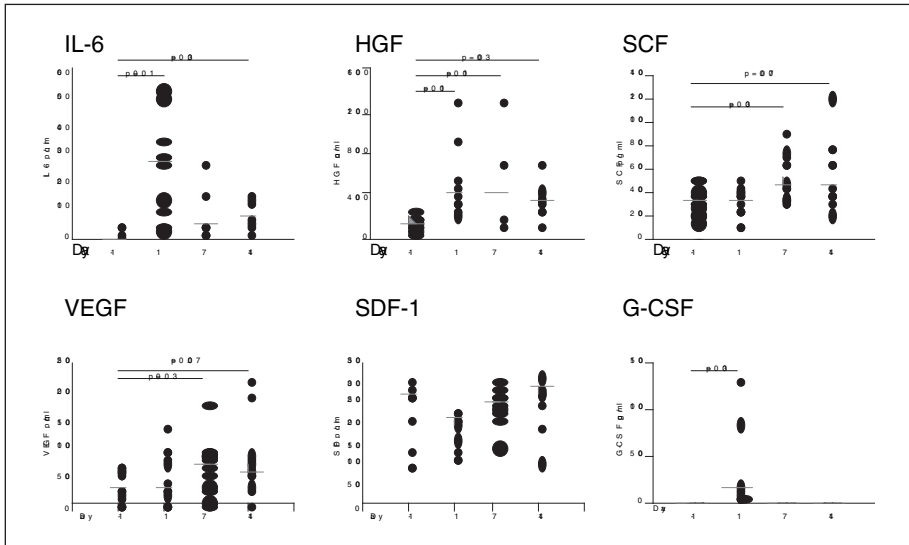


Fig. 6 - Liver resection augments the serum level of multiple cytokines. When serum cytokine levels were analyzed in patients undergoing liver resection, we found a significant increase of IL-6, HGF, SCF, VEGF, and G-CSF. The bold line indicates the median value.

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study reporting the mobilization of both hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells after OLT. We thus provide a strong rationale for the clinical observation of human liver cells deriving from circulating cells of extrahepatic origin upon tissue injury (8, 9). We demonstrated that, despite baseline impaired hematopoietic function, patients undergoing OLT and ischemia/reperfusion damage have a 3.4-fold increase of circulating CD34⁺ cells which is appreciable within 24 hours from surgery, peaks at days +7 and +14 and normalizes within 30 days. Phenotypic and functional analyses further showed that both primitive CD34⁺/CD90⁺ HSCs and more mature, committed CFU-C were mobilized into PB within 14 days from OLT. Of note, the early and significant elevation of the concentration of different subsets of hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells into PB occurred despite similar values of circulating leukocytes before and after OLT. Mobilization of HSCs was likely enhanced by increased serum levels of IL-6, SCF and G-CSF after OLT. In particular, G-CSF and SCF have been shown to enhance, in animals, the expression of the chemokine SDF-1 and its cognate receptor, CXCR4, on HSCs to recruit marrow cells to the injured tissue (22,29). Our results also suggest that SDF-1/CXCR4 axis may be implicated in stress-induced trafficking and migration to the liver of human HSCs for tissue repair. Thus, we extend previous studies that demonstrated the significant increase of the number of circulating CXCR4⁺ cells and the early decrease of SDF-1 plasma level after acute myocardial infarction (30). Similarly, mobilization of endothelial progenitors may be due to the increased serum level of VEGF following the vascular damage associated with OLT. As a matter of fact, circulating CD133⁺ and CD34⁺/VEGFR-2⁺ (KDR⁺) cells are known to contribute to neoangiogenesis after tissue ischemia and organ regeneration in animal models (31-33) after the release of angiogenic factors including VEGF. In humans, increased serum levels of VEGF have been recently associated with the mobilization of endothelial SC after acute myocardial infarction (30, 34, 5).

Thus, it is conceivable that hematopoietic and endothelial progenitors can play different roles, if any, in tissue repair. Since regeneration of the injured organ involves the proliferation of parenchymal cells as well as neovascularization, it may well be that tissue injury also induces the activation of progenitors for endothelium. These findings support the concept that "plasticity" may not be restricted to a unique SC population but, rather, may be a general property of marrow cells that redirect their transcriptional program under appropriate stimuli. Of note, mobilization of CD133⁺ hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells directly correlated with the length of the cold ischemia of the transplanted organ. Thus, it may be hypothesized that the greater is the extent of the tissue damage (reflected by the cold ischemia time) the higher is SC mobilization.

FISH analysis formally demonstrated the host origin of mobilized BM-derived CD34⁺ HSCs after OLT. In addition, molecular studies showed that only HSCs circulating after OLT, but not CD34⁺ cells evaluated before surgery or purified from G-CSF-mobilized healthy donors, expressed mRNAs for liver-specific epithelial

markers such as AFP and CK-19. Therefore, our data, support the hypothesis of the pool of tissue-committed BM SC readily available after tissue damage as previously proposed (30, 36). The engraftment of mobilized BM-derived SC to the injured liver, their actual role and the mechanism of action for tissue regeneration after OLT were topics beyond the scope of this study. However, previous papers (8, 9) have demonstrated that BM-derived cells can give raise to hepatocytes and cholangiocytes in transplanted livers although their engraftment efficiency and long-term survival was questioned (37, 38). Concerning the mechanism of action, both cell fusion and trans-differentiation may be considered a mechanism of SC plasticity, although not necessarily SC are involved (10, 11). From a therapeutic point of view, as long as the function of the damaged tissue is restored it may not be crucial to determine whether true trans-differentiation occurs as demonstrated in the fumarylacetoacetate hydrolase model of liver injury (3).

Whereas ischemia/reperfusion liver damage associated with OLT induced the extensive mobilization of several subsets of hematopoietic and endothelial BM-derived SC, liver resection was a weaker stimulus to recruit significant numbers of BM cells into PB despite the increase of the serum level of hemopoietic/mobilizing cytokines. Thus, the physiological stress associated with major liver surgery, *per se*, only induced the significant mobilization of total CD34⁺ HSCs. Moreover, we did not find any correlation between the extent of liver resection (and subsequent tissue reconstitution) and mobilization. Taken together, these findings suggest that activation of resident stem/progenitor cells may play the major role in tissue repair after liver resection, although cell therapy with HSCs may significantly help this process (39, 40). Thus, it may be hypothesized that different stress signals (i.e. OLT or liver resection) may induce the activation of different BM-derived cell populations. Of note, the reduced serum levels of SCF, one of the main cytokines to stimulate HSC proliferation and mobilization, may account for the decreased concentration of circulating BM-derived SC in resected patients for primary or metastatic cancer as compared to healthy controls. Similarly, SCF concentration was lower after liver resection than after OLT and this finding may help explaining the different extent of mobilization of patients submitted to different surgical procedures. Conversely, the baseline serum level of HGF was higher in both study populations as compared to normal controls and increased further after liver resection, thus suggesting that HGF may be the main cytokine involved in tissue repair by acting on resident liver cells and by recruiting HSCs.

In summary, our data extend to the liver the observation that SC recruitment into PB may be a relevant physiological process in case of tissue injury (30, 36) and underline the potential role of BM-derived cells for cell therapy of liver diseases as recently proposed (39, 40).

References

1. Alison MR., Poulson R., Forbes SJ. Update on hepatic stem cells. *Liver* 2001; 21: 367-373.
2. Crosby HA., Kelly DA., Strain AJ. Human hepatic stem-like cells isolated

- using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium *Gastroenterology* 2001; 120: 534-544.
3. Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.* 2000; 6: 1229-1234.
 4. Petersen BE., Bowen WC., Patrene KD., et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science.* 1999; 284: 1168-1170.
 5. Theise ND., Badve S., Saxena R., et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology.* 2000; 31: 235-240.
 6. Wang X., Ge S., McManara G., et al. Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood.* 2003; 101: 4201-4208.
 7. Krause DS., Theise ND., Collector MI. et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell.* 2001; 105: 369-377.
 8. Alison MR., Poulson R., Jaffery R., et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature.* 2000; 406: 257.
 9. Theise ND., Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology.* 2000; 32: 11-16.
 10. Willenbring H., Bailey AS., Foster M. et al. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nat Med.* 2004; 10: 744-748.
 11. Camargo FD., Finegold M., Goodell MA. Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners. *J Clin Invest.* 2004; 9: 1266-1270.
 12. Harris RG., Herzog EL., Bruscia EM., et al. Lack of fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science.* 2004; 305: 90-93.
 13. Jang YY., Collector MI., Baylin SB. et al. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol.* 2004; 6: 532-539.
 14. Korbling M., Katz RL., Khanna A. et al. Hepatocytes and hepithelial cells of donor origin in recipients of peripheral blood stem cells. *N Engl J Med* 2002; 346: 738-746.
 15. Danet GH., Luongo JL., Butler G. et al. C1qRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 10441-10445.
 16. Zhao Y., Glesne D., Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2426-2431.
 17. Wulf GG., Luo K-L., Jackson KA. et al. Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished by bone marrow stem cells. *Haematologica* 2003; 88: 368-378.
 18. Jiang Y., Jahagirdar BN., Reinhardt R.L et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49.
 19. Schwartz RE., Reyes M., Koodie L. et al. Multipotent adult progenitor cells

- from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302.
20. Korbling M., Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair-a new therapeutic concept ? *N Engl J Med.* 2003; 349: 570-582
 21. Lemoli RM, Bertolini F., Cancedda R. et al. Stem cell plasticity: time for a reappraisal ? *Haematologica.* 2005; 90:360-381.
 22. Kollet O., Shvitiel S., Chen Y-Q. et al. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest.* 2003; 112: 160-169.
 23. Yannaki E., Athanasiou E., Xagorari A. et al. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol.* 2005; 33: 108-119.
 24. Gehling UM, Willems M., Dandri M. et al. Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of hematopoietic progenitor cells in human healthy liver donors. *J Hepatol.* 2005; XX: 1-9.
 25. Lemoli RM., Tafuri A., Fortuna A. et al. Cycling status of CD 34+ cells mobilized into peripheral blood of healthy donors by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 1997; 89: 1189-1196.
 26. Lemoli RM., Ferrari D., Fogli M. et al. Extracellular nucleotides are potent stimulators of human hematopoietic stem cells *in vitro* and *in vivo*. *Blood.* 2004; 104: 1662-1670.
 27. Collins RH., Anastasi J. Terstappen LWMM et al. Brief report: Donor-derived long-term multilineage hematopoiesis in a liver-transplant recipient. *N Engl J Med.* 1993; 328: 762-765.
 28. Petit I., Kravitz-Szyper M., Nagler A. et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and upregulating CXCR4. *Nat Immunol.* 2002; 3: 687-694.
 29. Ratajczak MZ., Majka M., Kucia M. et al. Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *Stem Cells.* 2003; 21: 363-371.
 30. Wojakowski W., Tendera M. Michalowska A. et al. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ Stem Cells, and Mononuclear Cells Expressing Early Cardiac, Muscle, and Endothelial Markers into Peripheral Blood in Patients with Acute Myocardial Infarction. *Circulation.* 2004; 110: 3213-3220.
 31. Kocher AA., Schuster MD., Szabolcs MJ et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 2001; 7: 430-436.
 32. Gill M., Dias S., Hattori K. et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2+AC133+ endothelial precursors cells. *Circ Res.* 2001; 88: 167-174.

33. Peichev M., Naiyer AJ., Pereira D. et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁺ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000; 95: 952-958.
34. Shintani S., Murohara T., Ikeda H. et al. Mobilization of Endothelial Progenitor Cells in Patients with Acute Myocardial Infarction. *Circulation*. 2001; 103: 2776-2779.
35. Massa M., Rosti V., Ferrario M. et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood*. 2005; 105: 199-206.
36. Kucia M., Ratajczak J., Reza R. et al. Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells, Mol, Dis*. 2004; 32: 52-57.
37. Fogt F., Beyser KH., Poremba C. et al. Recipient-derived hepatocytes in liver transplants: A rare event in sex-mismatched transplants. *Hepatology*. 2002; 36: 173-176.
38. Thorgeirsson SS. Grisham JW. Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: A critical review of the evidence. *Hepatology*. 2006; 43: 2-8.
39. Am Esch JS. 2nd, Knoefel WT., Klein M. et al Portal application of autologous CD133⁺ bone marrow cells to the liver-A novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells*. 2005; 23: 463-470.
40. Gordon MY., Levicar N., Pai M. et al. Characterisation and clinical application of human CD34⁺ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by G-CSF. *Stem Cells* 10.1634/stem-cells.2005-0629.

Prospettive di terapia rigenerativa extra-ematologica con cellule staminali osteomidollari

Carlo Bernasconi

Già Professore Ordinario di Ematologia, Università di Pavia.

Consulente ematologo e coordinatore della ricerca sulle cellule staminali, IRCCS Fondazione “Salvatore Maugeri”, Pavia

È acquisizione oggi da tutti condivisa che il sistema delle cellule staminali adulte è molto più flessibile di quanto ritenuto in passato, specie in condizioni di danni tissutali. Abbiamo appena incominciato a capire che cellule staminali, residenti nei vari tessuti o nel midollo osseo, possono venir mobilizzate nel sangue circolante ed agire come fornitori di progenitori staminali capaci di riparare danni di organi e tessuti a diversa localizzazione (cuore, sistema nervoso, fegato, pancreas, ecc). Il potenziale terapeutico di questa acquisizione è straordinariamente vasto. Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche per la rigenerazione ematologia e immunologica è procedura oggi universalmente condivisa. Per contro, il tentativo di riparare danni tissutali e malattie degenerative extra-ematologiche con l'impiego di cellule staminali ottenute dal midollo osseo, è una strategia terapeutica del tutto iniziale. Nell'esaminare tale argomento bisogna innanzitutto considerare il midollo osseo come sede di molteplici popolazioni di cellule staminali, e interpretare il fenomeno indicato con il termine di plasticità delle cellule staminali.

Midollo osseo come sede di molteplici popolazioni di cellule staminali

È sicuramente acquisito che il midollo osseo contiene, oltre a cellule staminali ematopoietiche (*HSCs, hematopoietic stem cells*), anche cellule staminali mesenchimali (*MSCs, mesenchymal stem cells*) e cellule progenitrici endoteliali (*EPCs, endothelial progenitor cells*). Fra le cellule di origine mesenchimale sono state poi descritte cellule staminali pluripotenti, individuate per la prima volta da Friedenstein et al. (1982), e di cui le più note sono le *multipotent adult progenitor cells (MAPCs)* ottenute in colture da Jiang et al. (2002). Inoltre, è stato di recente ipotizzato che il midollo osseo possa contenere quantità molto scarse di cellule staminali tessuto-commissionate (*tissue-committed stem cells, TCSCs*) e forse anche di più primitive cellule staminali pluripotenti (*pluripotent stem cells*,

PSCs), che durante l'ontogenesi si sono accasate nel midollo osseo perché vi hanno trovato condizioni favorevoli alla loro sopravvivenza (Kucia et al., 2005). Per adempiere ai criteri di multipotenzialità una singola cellula staminale dovrebbe essere capace di automantenersi, proliferare e differenziare lungo le varie linee cellulari. Questo rigoroso criterio è rispettato per le HSCs, che in modelli sperimentali hanno dimostrato come una singola cellula staminale possa consentire il recupero ematologico e immunologico.

Anche per le MSCs sono state raccolte prove sperimentali sicure che una singola cellula possa differenziare lungo le linee osteogenica, adipocitica e condrogenica. Inoltre, con cellule accessorie di origine ematopoietica (soprattutto macrofagi e linfociti) e con la matrice extramidollare, le MSCs generano il microambiente midollare essenziale per il mantenimento, proliferazione e differenziazione delle HSCs.

Non esiste invece alcuna "classica" spiegazione per le più recenti osservazioni che cellule staminali derivate dal midollo osseo possano contribuire a riparare danni di vari tessuti e organi, come ad esempio danni neurologici (Keene et al., 2003) o danni prodotti da lesioni ischemiche miocardiche (Orlic et al., 2001). Queste osservazioni hanno richiesto la formulazione di una nuova ipotesi: cellule staminali adulte del midollo osseo, sia di origine ematopoietica che non-ematopoietica, possono trans-differenziare attraverso i classici foglietti germinali embrionali ectodermico, mesodermico e endodermico. Verfaillie et al. (2003) hanno pubblicato dati ottenuti *in vitro* e *in vivo* che suggeriscono come una singola cellula, ottenuta da una popolazione midollare primitiva nella frazione CD45-, e indicata come MAPC, possa differenziare in tessuti funzionali originati dai tre foglietti germinali embrionali. In passato questo alto livello di multipotenzialità era stato osservato solo nelle cellule staminali embrionali; questi nuovi dati portano invece a considerare il midollo osseo come sorgente potenziale di cellule staminali per trattare un vasto ambito di malattie degenerative e di danni tissutali.

Il midollo osseo è anche la sorgente delle EPCs, il cui isolamento e caratterizzazione sono stati per la prima volta segnalati da Asahara et al. (1997). Si ritiene che queste cellule derivino, almeno nel topo, da un precursore comune denominato "emangioblasto", che può dare origine a HSCs, EPCs e cellule muscolari lisce (Pelosi et al., 2002; Bailey et al., 2004). Tipicamente queste cellule vengono definite sulla base dell'espressione di alcuni marcatori sulla superficie cellulare (CD34, Flk-1 e AC133), e durante la differenziazione acquistano i marcatori della linea endoteliale. Le EPCs *in vitro* possono espandersi per prolungati periodi di tempo, e *in vivo* possono essere reclutate nelle aree di danno tissutale contribuendo alla vasculogenesi nella vita post-natale.

Ratajczak e collaboratori hanno di recente segnalato che il midollo osseo contiene una popolazione altamente mobile di cellule staminali CXCR4+, che esprimono i vari marcatori di cellule staminali tessuto-commissionate (TCSCs). Il midollo osseo sarebbe quindi un "nascondiglio" per le TCSCs CXCR4+, che vi troverebbero nicchie favorevoli per il loro mantenimento, e da cui potrebbero venir mobilitate in risposta di una aumentata produzione periferica di SDF-1 nella sede di danni tissutali (Ratajczak et al., 2003; Kucia et al., 2005).

Plasticità o eterogeneità delle cellule staminali midollari?

Il dogma centrale della biologia delle cellule staminali adulte è stato che le cellule isolate da un particolare tessuto possano differenziare solo lungo le linee del tessuto di origine. Parecchi studi pubblicati negli ultimi anni hanno però cambiato questa idea, dimostrando che cellule staminali tessuto-specifiche possono presentare una considerevole plasticità, e oltrepassare i confini della restrizione lineare per dare origine a tipi cellulari di altre linee, anche derivate da foglietti germinali differenti. Tuttavia, la mancanza di una precisa definizione del termine “plasticità” ha generato talvolta confusione, poichè parecchie ricerche hanno fallito nel dimostrare che veramente una singola cellula abbia potuto differenziare lungo molteplici linee cellulari. Verfaillie e collaboratori (2003, 2004) hanno quindi proposto tre criteri principali per definire la plasticità delle cellule staminali:

- 1) una singola cellula differenzia lungo molteplici linee cellulari;
- 2) le cellule differenziate sono funzionanti *in vitro* e *in vivo*;
- 3) l'attecchimento del trapianto è robusto e persistente.

Sono stati proposti parecchi possibili meccanismi per spiegare la plasticità delle cellule staminali del midollo osseo, e un meccanismo necessariamente non preclude le altre possibilità (Herzog et al., 2003). Un meccanismo potrebbe essere che cellule del midollo osseo che differenziano nei diversi tipi cellulari rappresentino in realtà una popolazione inaspettata di cellule staminali altamente pluripotenti, localizzata nel midollo osseo e non ancora commissionata per diventare sangue. Alternativamente, queste cellule sono HSCs commissionate che possono transdifferenziare. Le cellule commissionate sono quelle che hanno iniziato un percorso di differenziazione terminale, probabilmente attraverso modificazioni irreversibili nella conformazione del DNA. La transdifferenziazione si riferisce alla capacità di un tipo cellulare commissionato di cambiare il proprio pattern di espressione genica in quello di un tipo cellulare completamente diverso. I meccanismi potenziali di questo cambiamento comprendono una transdifferenziazione indiretta, che richiede una dedifferenziazione seguita da una maturazione lungo un percorso alternativo, e una transdifferenziazione diretta, in cui vi è una diretta transizione nel pattern di espressione genica.

Un meccanismo alternativo per la plasticità potrebbe essere la fusione di una cellula derivata dal midollo osseo con una cellula non-ematopoietica, in modo da convertire il pattern di espressione genica della cellula midollare originale (ad esempio un macrofago) in quello della cellula non-ematopoietica partner nella fusione. Quando una fusione cellulare è responsabile della riprogrammazione del pattern di espressione genica di una cellula adulta, questa naturalmente cambia fenotipo (Terada et al., 2002); tale fenomeno rappresenta ancora una manifestazione di plasticità, ma le cellule coinvolte non sono cellule staminali. Nel loro complesso gli studi sulla fusione cellulare hanno sinora fornito risultati molto controversi, specie per quanto riguarda la funzionalità delle cellule risultanti.

Recentemente è stata proposta una spiegazione alternativa del fenomeno dell'apparente plasticità di cellule staminali, osservato dopo infusione di midollo osseo

e in precedenza attribuito a transdifferenziazione. Secondo tale spiegazione il midollo osseo contiene, oltre alle HSCs, anche piccole sottopopolazioni di poche cellule staminali tessuto-commissionate, e forse anche più primitive cellule staminali pluripotenti, che si sono accumulate nel midollo osseo durante l'ontogenesi perché vi hanno trovato un ambiente favorevole alla loro sopravvivenza (Ratajczak et al., 2003; Kucia et al., 2005). Considerando tale ipotesi, il midollo osseo potrebbe essere sede di popolazioni eterogenee di cellule staminali a differente livello di differenziazione, iniziando da cellule primitive pluripotenti a cellule staminali già tessuto-commissionate. Queste cellule costituirebbero nel midollo osseo un pool di riserva di cellule mobili, che dopo un danno tessutale (ad esempio un infarto miocardico o uno stroke), richiamate da appropriate chemochine, potrebbero essere immesse nel sangue periferico per concorrere a riparare l'organo danneggiato. Così, la presenza nel midollo osseo di popolazioni eterogenee di cellule staminali potrebbe spiegare semplicemente un apparente fenomeno di plasticità cellulare.

L'ipotesi dell'eterogeneità, piuttosto che plasticità, delle cellule staminali osteomidollari è completata dal ruolo svolto dall'asse chemochina SDF-1 / recettore CXCR4 nel traffico delle cellule staminali fra midollo osseo, sangue periferico e organo danneggiato. L'identità delle citochine/chemochine, oltre all'SDF-1, rilasciate dalle nicchie di cellule staminali nei vari organi deve ancora essere studiata.

Prospettive di terapia rigenerativa

Nella letteratura corrente vi è un enorme interesse per i tentativi di correggere con cellule staminali adulte derivate dal midollo osseo danni o processi degenerativi a carico di altri organi o tessuti. Una potenziale "plasticità" delle cellule del midollo osseo è stata osservata nei confronti di fegato, cuore e muscolo cardiaco, muscoli scheletrici, sistema nervoso centrale, rene, pancreas, polmone, cute, tratto gastrointestinale, ecc. (Herzog et al., 2003). Solo la nostra immaginazione pone un limite a questa potenziale capacità riparativa, anche se in realtà il fenomeno sembra avvenire in misura quantitativamente molto modesta.

In base a quanto sopra riportato, le cellule staminali derivate dal midollo osseo adulto candidate ad essere utilizzate per una terapia rigenerativa sono le HSCs, le MSCs, le MAPCs ed eventualmente altre cellule staminali pluripotenti e cellule staminali tessuto-specifiche annidate nel midollo osseo. Parecchi studi di plasticità riportati in letteratura non aiutano a risolvere questo quesito, perché la popolazione cellulare di partenza è il sangue intero o comunque cellule midollari mononucleate non frazionate; ciò rende impossibile la caratterizzazione delle cellule staminali responsabili della plasticità osservata.

Le cellule staminali possono venir raccolte direttamente dal midollo osseo oppure dal sangue periferico dopo mobilitazione con appropriate citochine. Nell'applicazione clinica, al fine della ricostituzione ematologia le due sorgenti danno risultati simili. È possibile che questo non accada per la riparazione tessutale; infatti, secondo i dati comunicati dal gruppo di Hows, le MSCs vengono facilmente isolate dal midollo osseo (Wexler et al., 2003; Hows, 2005), mentre

sono contenute in quantità molto scarsa (o del tutto assenti) nel sangue periferico mobilizzato. Le MSCs sono rare o assenti anche nel sangue di cordone ombelicale. Così, il midollo osseo appare essere la miglior sorgente di MSCs, di cui sono oggi note le peculiari caratteristiche di elevata plasticità e di bassa immunogenicità, particolarmente interessanti per procedure trapiantologiche, anche allogeneiche, di riparazione tissutale.

Studi di rigenerazione tissutale hanno poi posto il quesito se il miglioramento funzionale dell'organo bersaglio possa essere direttamente attribuito alle cellule differenziate originate dalle cellule osteomidollari, oppure il risultato di meccanismi indiretti che comprendono la produzione di citochine da parte di cellule di derivazione midollare o del tessuto danneggiato e una neovascolarizzazione con intervento di cellule progenitrici endoteliali.

Infine, lo studio di chemochine/citochine e di segnali cellulari che possono condizionare il traffico di cellule staminali nel sangue periferico, midollo osseo e tessuti assume poi particolare importanza secondo l'ipotesi formulata da Ratajczak et al. (2003), dell'accumulo nel midollo osseo durante l'ontogenesi di popolazioni eterogenee di TCSCs CXCR4+. Infatti, il coinvolgimento di citochine/chemochine e di segnali cellulari tessuto-specifici può spiegare perché TCSC circolanti hanno un'elevata affinità, oltre che per le nicchie nel midollo osseo, anche per le nicchie negli organi verso cui esse sono commissionate.

Bibliografia

1. Friedenstein AJ., Latzinik NW., Grosheva AG. et al. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Exp. Hematol.*, 10, 217, 1982.
2. Kucia M., Ratajczak J., Ratajczak MZ. et al. Bone marrow as a source of circulating CXCR4(+) tissue-committed stem cells. *Biol. Cell.* 97, 133, 2005.
3. Kucia M., Ratajczak J., Ratajczak MZ. et al. Are bone marrow stem cells plastic or heterogeneous – That is the question. *Exp. Hematol.*, 33, 613, 2005.
4. Jiang Y., Jahagirdar BN., Reinhardt RL. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418, 41, 2002.
5. Keene CD., Ortiz-Gonzalez XR., Jiang Y. et al. Neural differentiation and incorporation of bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells after single cell transplantation into blastocyst stage mouse embryos. *Cell Transpl.*, 12, 201, 2003.
6. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S. et al. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 938, 221, 2001.
7. Asahara T., Murohara T., Sullivan A. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275, 964, 1997.
8. Pelosi E., Valtieri M., Coppola S. et al. Identification of hemangioblast in postnatal life. *Blood*, 100, 3202, 2002.
9. Bailey AS., Jiang S., Afentoulis M. et al. Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood*, 103, 13, 2004.

10. Ratajczak MZ., Majka M., Kucia M. et al. Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *Stem Cells*, 21, 363, 2003.
11. Verfaillie CM., Schwartz R., Reyes M. et al. Unexpected potential of adult stem cells. *Ann.N. Y. Acad. Sc.* 996, 231, 2003.
12. Lakshmipathy U., Verfaillie C. Tem cellplasticity. *Blood Rev.* 19, 29, 2004.
13. Herzog EL., Chai L., Krause DS. et al. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, 102, 3483, 2003.
14. Terada N., Hamazaki T., Oka M. et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 416, 542, 2002.
15. Wexler SA., Donaldson C., Denning-Kendall P. et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilicalcord and mobilized adult blood are not. *Br. J. Haematol.*, 121, 368, 2003.
16. Hovs J. Adult stem cell therapy beyond haematopoietic stem cell transplantation? An update. *Transplant Immunol.*, 14, 221, 2005.

Cellule progenitrici multipotenti isolate da glomeruli renali umani adulti

Paola Romagnani

Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Università di Firenze, Policlinico Careggi

L'insufficienza renale rappresenta una delle emergenze sanitarie dei prossimi anni. I pazienti affetti da insufficienza renale sono infatti in continuo aumento, e le uniche possibilità di trattamento sono costituite dalla dialisi e dal trapianto. Lo sviluppo di una terapia cellulare mirata a ricostituire i tessuti lesi potrebbe quindi apportare un miglioramento decisivo al trattamento dell'insufficienza renale, e rappresentare una delle maggiori possibilità alternative per il trattamento di questi pazienti. Il rene adulto è un organo anatomicamente complesso, con basso turnover ma grande capacità di rigenerazione e riparazione, come dimostrato dal recupero funzionale che avviene dopo danno glomerulare o tubulare (1, 2). Ciò nonostante, non è ancora stata identificata l'origine delle cellule renali che ricostituiscono il tessuto lesso. Lavori precedenti avevano suggerito che il midollo osseo potesse rappresentare una fonte di progenitori in grado di contribuire al turnover e alla riparazione tubulare (3, 4). Tuttavia, studi recenti hanno dimostrato che sono cellule intrarenali non identificate, e non cellule derivate dal midollo osseo, a dare il contributo maggiore alla rigenerazione del tubulo lesso (5, 6). In alcuni recenti lavori sono state identificate cellule renali che potrebbero costituire i progenitori renali tubulari (7, 8). Tuttavia, nonostante il danno glomerulare sia critico per l'inizio della patologia renale irreversibile, non sono ancora noti potenziali progenitori glomerulari, e soprattutto non sono note popolazioni di cellule staminali renali multipotenti.

Nel tentativo di individuare eventuali popolazioni di cellule staminali residenti, abbiamo valutato l'espressione di diversi marcatori tipici di cellule staminali in reni umani adulti, nonché le caratteristiche funzionali proprie delle cellule staminali, quali la clonogenicità, l'auto-rinnovamento e la multipotenzialità. Mediante immunofluorescenza (Figura 1) abbiamo dimostrato che i due marcatori staminali CD133 e CD24 erano contemporaneamente espressi da un piccolo subset di cellule localizzate al polo urinario della Capsula di Bowman (9).

Queste cellule sono state recuperate mediante coltura di glomeruli isolati e mediante metodiche di separazione immunomagnetica. Abbiamo così ottenuto una popolazione di cellule CD133+CD24+, che rappresentano in condizioni nor-

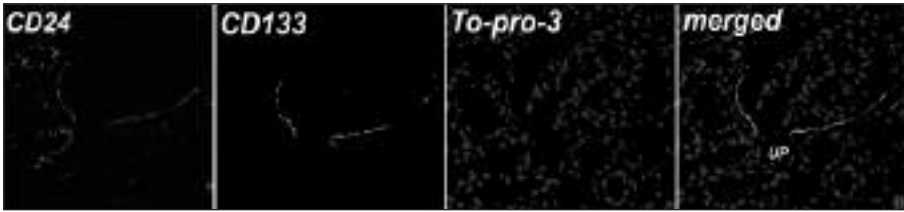


Fig. 1 - La co-espressione dei markers di SC, CD24 e CD133, identifica un subset di cellule epiteliali al polo urinario della capsula di Bowman, nel rene umano adulto. Modificato da Sagrinati C et al. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Sep; 17(9): 2443-56.

mali lo 0.5-4% delle cellule renali. Le cellule CD133+CD24+ non esprimevano marcatori di differenziazione renale, a differenza delle cellule CD133-CD24- che rappresentavano circa il 95% delle cellule renali e che esprimevano marcatori di differenziazione propri di varie porzioni del nefrone. Le cellule CD133+CD24+ inoltre, esprimevano fattori di trascrizione tipici delle cellule staminali come Oct-4 e Bmi-1 e mostravano una sopravvivenza prolungata (circa 70 population doublings in 3-4 mesi), ed una elevata capacità clonogenica.

Cloni derivati da singole cellule staminali (Figura 2) mostravano una spiccata capacità multidifferenziativa. Da progenie di singole cellule sono state derivate cellule osteoblastiche, cellule adipocitarie, cellule tubulari renali con caratteristiche di varie porzioni del nefrone e cellule con caratteristiche fenotipiche e funzionali delle cellule neuronali.

Per verificare se le cellule staminali da noi identificate ed isolate nel rene umano adulto potessero avere la capacità di rigenerare tessuto renale danneggiato, è stato utilizzato un modello di necrosi tubulare acuta in topi SCID. Questo modello prevede l' iniezione per via intramuscolare di glicerolo ipertonico, che porta a massiva miolisi ed emolisi; la mioglobina e l'emoglobina circolanti provocano di conseguenza un grave danno tubulare, generando un quadro di necrosi tubulare acuta. Il picco del danno tubulare si verifica 3-4 giorni dopo l'iniezione, per poi

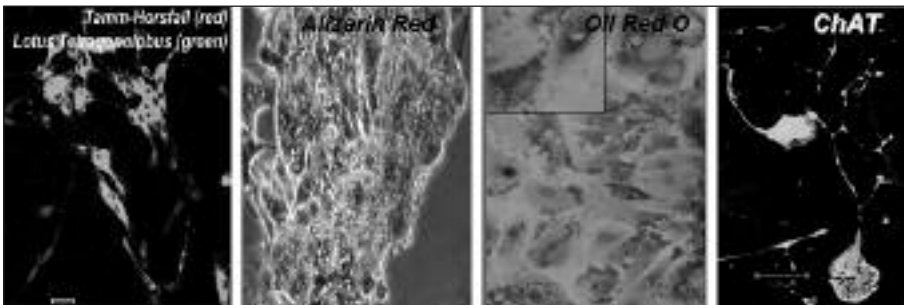


Fig. 2 - Cellule ottenute da singoli cloni CD133+CD24 possono essere indotte a differenziare a cellule tubulari di varie porzioni del neurone (che esprimono la proteina di Tamm-Horsfall e la lectina Lotus Tetragonolobus), cellule osteoblastiche (positive alla colorazione con l'Alizarin Red), adipocitarie (positive alla colorazione con l'Oil Red O e cellule nervose (che esprimono la proteina per la ChAT). Modificato da Sagrinati C et al. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Sep; 17(9): 2443-56.

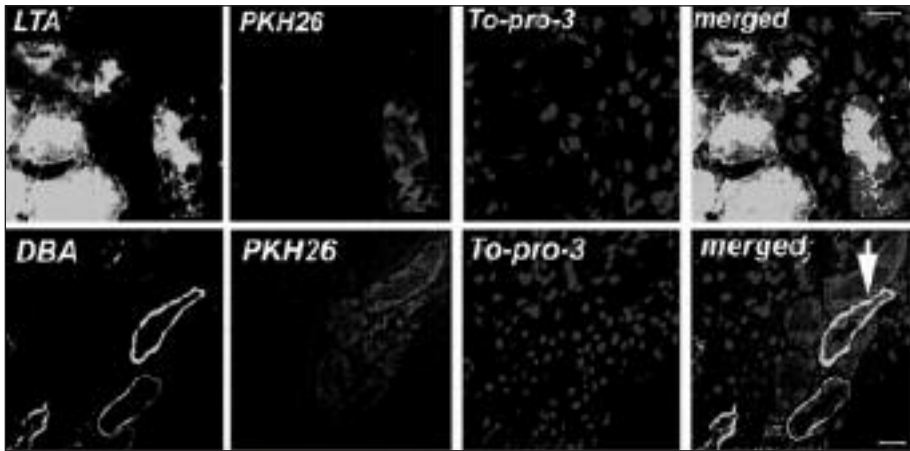


Fig. 3 - Integrazione delle cellule CD133+CD24+ in reni di topi con necrosi tubulare acuta, a livello di differenti strutture tubulari renali (LTA marca tubuli prossimali, DBA tubuli distali e dotti collettori). Modificato da Sagrinati C et al. J Am Soc Nephrol. 2006 Sep; 17(9): 2443-56.

migliorare spontaneamente dopo circa 10 giorni, lasciando tuttavia un danno funzionale residuo. Utilizzando questo modello sperimentale è stato verificato che le cellule CD133+CD24+ *in vivo* erano capaci di integrarsi nel tessuto renale e di riparare il danno tubulare. Questa osservazione è stata dimostrata colorando le cellule col colorante rosso PKH26 per poi inocularle per via endovenosa a topi sofferenti di necrosi tubulare acuta al picco del danno. Cellule rosse si trovavano

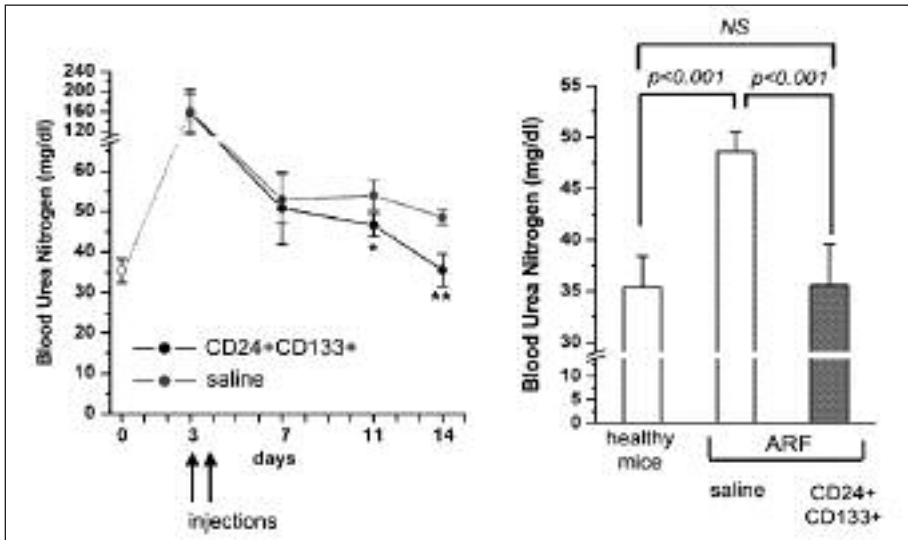


Fig. 4 - L'inoculo delle cellule CD133+CD24+ protegge i topi trattati con glicerolo dal danno residuo della funzione renale. A sinistra, cinetica di misurazione dell'azotemia; a destra, dettaglio del 14° giorno. Modificato da Sagrinati C et al. J Am Soc Nephrol. 2006 Sep; 17(9): 2443-56.

nell'interstizio e nelle strutture tubulari renali, dove avevano acquisito marcatori di porzioni differenti del nefrone (Figura 3). Questo risultato si osservava inoculando cellule CD133+CD24+, ma non inoculando soluzione salina o cellule CD133-CD24-.

Inoltre, l'integrazione delle cellule è stata dimostrata anche mediante immunostochimica per l'HLA umano e mediante ricerca attraverso tecnica FISH del cromosoma Y in reni ottenuti da topi femmine inoculati con cellule umane maschili. Per determinare se le cellule CD133+CD24+ fossero capaci di migliorare la funzione renale di topi con necrosi tubulare acuta, sono stati misurati i livelli di azoto ureico (BUN) nel siero di topi inoculati con queste cellule dopo danno da gliceroleso. L'inoculo intravenoso di CD133+CD24+, ma non quello di salina o di cellule CD133-CD24-, si associava ad un completo ripristino della funzione renale misurabile attraverso i livelli sierici di azotemia, che tornavano nella norma soltanto nei topi trattati con le cellule CD133+CD24+ (5). In particolare, al giorno 14, i topi trattati con questa popolazione mostravano livelli di BUN paragonabili a quelli dei topi sani, mentre erano significativamente ridotti rispetto a quelli di topi trattati con soluzione fisiologica; a conferma ulteriore dell'effetto specifico delle CD133+CD24+, l'inoculo della popolazione CD24⁺CD133⁻ non è risultato protettivo nei confronti del danno renale (Figura 4).

Infine, il miglioramento della funzione renale nei topi trattati con le CD133+CD24+ si associava anche ad una più efficace riparazione del tessuto lesso. Mediante immunofluorescenza è stata valutata la presenza di fibrosi tubulo-interstiziale e periglomerulare a 14 giorni dall'induzione del danno, tramite l'espressione di α -SMA, che marca i miofibroblasti, e di TGF- β 1, altro marcatore di fibrosi: nei reni dei topi di controllo trattati con salina o con cellule CD133-CD24- si osservavano estese aree di fibrosi, mentre il tessuto renale dei topi trattati con cellule CD133+CD24+ presentava solo limitate aree di fibrosi.

I risultati di questo studio dimostrano che esiste una popolazione di cellule staminali localizzata al polo urinario della capsula di Bowman, che coesprime i marcatori CD133+ e CD24+ e che esibisce proprietà di auto-rinnovamento e capacità multidifferenziativa. Queste cellule mostrano capacità rigenerativa in modelli sperimentali di insufficienza renale acuta e rappresentano pertanto una possibile fonte di cellule per la messa a punto di nuove strategie terapeutiche dell'insufficienza renale.

Bibliografia

1. Brodie JC., Humes HD. Stem cell approaches for the treatment of renal failure. *Pharmacol Rev.* 2005; 57: 299-313.
2. Anglani F., Forino M., Del Prete D., Tosetto E., Torregrossa R, D'Angelo A.. In search of adult renal stem cells. *J Cell Mol Med.* 2004; 8: 474-487.
3. Lin F., Cordes K., Li L., Hood L., Couser WG., Shankland SJ., Igarashi P. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* 14: 1188-1199, 2003.

4. Morigi M., Imberti B., Zoja C., Corna D., Tomasoni S., Abbate M., Rottoli D., Angioletti S., Benigni A., Perico N., Alison M., Remuzzi G. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 15: 1794-1804, 2004.
5. Lin F., Moran A., Igarashi P. Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney. *J Clin Invest* 115: 1756-1764, 2005
6. Jeremy S., Kwon Moo Park D., Hsiao LL., Kelley VR., Scadden DT., Ichimura T., Bonventre VJ. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest* 115: 1743-1755, 2005.
7. Bussolati B., Bruno S., Grange C., Buttiglieri S., Deregibus MC., Cantino D., Camussi G. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am. J. Pathol.* 2005; 166: 545-555.
8. Oliver JA., Maarouf O., Cheema FH., Martens TP., Al-Awqati Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest.* 2004; 114: 795-804.
9. Sagrinati C., Netti GS., Mazzinghi B., Lazzeri E., Liotta F., Frosali F., Ronconi E., Meini C, Gacci M, Squecco R, Carini M, Gesualdo L, Francini F, Maggi E, Annunziato F, Lasagni L., Serio M., Romagnani S., Romagnani P. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidney". *JASN.* 2006; 9: 2443-56.

Rigenerazione miocardica mediata da cellule staminali: potenziale endogeno e fonti extracardiache

Federico Quaini^{1,6}, Ezio Musso⁶, Francesco Fagnoni⁴, Konrad Urbanek⁵, Gallia Graiani^{2,6}, Caterina Frati^{2,6}, Costanza Lagrasta^{2,6}, Francesca Ferraro¹, Alice Belletti^{2,6}, Mirca Lazzaretti^{2,6}, Stefano Cavalli^{2,6}, Alessandro Boni⁵, Donatella Stilli⁶, Eugenio Quaini⁵, Roberto Sala³, Annarosa Leri³, Piero Anversa⁵

Dipartimenti di ¹Medicina Interna e Scienze Biomediche;

²Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Anatomia Patologica;

³Medicina Sperimentale e Clinica, Biologia Evolutiva, Università di Parma;

⁴Laboratorio di Oncologia Sperimentale, Fondazione Maugeri, Pavia;

⁵Dipartimento di Cardiocirurgia, Poliambulanza, Brescia, Cardiovascular Research Institute, New York Medical College, Valhalla, New York;

⁶CISTAC: Centro Interdipartimentale di Ricerca sulla Biologia ed Applicazioni Cliniche delle Cellule Staminali Cardiache

Introduzione

La Medicina Rigenerativa rappresenta un innovativo campo di ricerca e di applicazione clinica che può rivoluzionare la fisiopatologia e la cura delle malattie degenerative.

La plasticità o transdifferenziazione delle cellule staminali, definita come capacità di dare origine a cellule appartenenti a tessuti diversi dalla loro sede di reperi, ha portato a numerose osservazioni in campo sperimentale e clinico. Le cellule midollari sono le più studiate ed impiegate nell'uomo, in quanto le più conosciute e agevolmente reperibili, ma permangono molti dubbi sulla loro reale efficienza differenziativa verso i citotipi del tessuto da riparare. Al momento le uniche cellule che possano garantire una ricostituzione completa di qualsiasi organo in quanto "totipotenti" sono le cellule staminali embrionali se ottenute nelle prime fasi di sviluppo della blastocisti. Successivamente, anche nel periodo embrionale le cellule staminali sembrano ridurre parzialmente la propria capacità differenziativa in tutti i noti tipi cellulari e per questo sono definite "pluripotenti". Durante il periodo fetale e nella vita adulta invece sono state scoperte cellule staminali "multipotenti" in quanto in grado di dare origine ad elementi cellulari originati da tutti i tre foglietti embrionali. Esistono tuttavia due importanti irrisolti problemi sulla possibile applicazione clinica di queste cellule staminali rappresentati dalla loro immu-

nogenicità e dalle limitate conoscenze sul controllo della loro proliferazione e differenziazione. La possibilità di creare rigetto è infatti intrinseca all'utilizzo delle cellule embrionali e in minor misura di quelle fetali in quanto impiegabili solo in condizioni di trapianto eterologo. Rimane invece plausibile un uso autologo delle cellule staminali adulte una volta validate le loro proprietà biologiche e stabilita la sicurezza terapeutica. I fattori ambientali che determinano proliferazione e differenziamento in vivo delle cellule staminali non sono ben conosciuti e in diverse condizioni patologiche non è noto il meccanismo che altera la funzione degli elementi cellulari deputati al controllo dell'omeostasi tissutale.

Negli ultimi anni è stato dimostrato come sia possibile sfruttare la potenza delle cellule staminali (CS) adulte nella rigenerazione dei tessuti. In particolare, esperimenti sull'animale hanno documentato la plasticità di queste cellule indicando che, se opportunamente usate, possono riparare un tessuto danneggiato indipendentemente dalla loro origine. In questo modo, CS emopoietiche adulte sono in grado di generare cuore e cervello o, viceversa, CS isolate dal cervello o dal muscolo generano midollo emopoietico. Studi più recenti hanno tuttavia ridimensionato la plasticità di queste cellule in quanto da diversi laboratori sono stati pubblicati dati che smentiscono o minimizzano la capacità transdifferenziante delle cellule staminali adulte. Questa apparente contraddizione può essere riconciliata dal concetto che in qualsiasi organo le cellule staminali residenti sono le più efficaci nel rigenerare il tessuto di appartenenza. In ogni caso questo problema deve essere affrontato a livello sperimentale prima di portare queste scoperte scientifiche ad una sicura applicabilità clinica.

Cellule staminali e rigenerazione cardiaca

Le recenti osservazioni pubblicate da diversi gruppi di ricerca, incluso il nostro, hanno dato un contributo importante da una parte alla conoscenza dei modelli sperimentali per l'individuazione dei possibili approcci di terapia cellulare atti a rigenerare il cuore e dall'altra alla documentazione che nel cuore dell'uomo adulto esistono cellule staminali capaci di rigenerare tutte le componenti del tessuto cardiaco. Il fatto di poter ricostruire sia muscolo sia arterie e capillari è un requisito fondamentale per l'efficacia di qualsiasi tentativo di rigenerazione cardiaca e le CS posseggono proprio questa potenzialità di generazione multilineare. La formazione o l'impianto di una sola delle componenti strutturali porterebbe ad un inevitabile insuccesso della manovra terapeutica.

Nei trials clinici sono stati utilizzati nell'uomo progenitori ottenuti da sangue circolante, da midollo emopoietico o da muscolo scheletrico per rigenerare il miocardio infartuato. Questi approcci non offrono garanzie terapeutiche complete per questi motivi:

- 1) la mancata documentazione dell'effetto cellulare rispetto alle necessarie associate manovre di rivascularizzazione;
- 2) la mancanza di generazione di una o più componenti strutturali;
- 3) l'incapacità delle cellule impiantate di interagire efficacemente con il tessuto cardiaco nei processi di eccito-contrazione. I nostri stessi studi hanno eviden-

ziato importanti limiti alla possibilità di generare miocardio maturo impiegando cellule staminali midollari. Infatti, a tre-quattro settimane dalla manovra rigenerativa, erano presenti elevati livelli di proliferazione e ridotta differenziazione di tutte le componenti cellulari e strutturali. Nonostante la generale positività degli studi clinici e sperimentali sull'impiego di cellule midollari, alcuni aspetti devono ancora essere chiariti per giustificare un loro impiego clinico su larga scala nelle diverse malattie cardiovascolari. Certamente nell'infarto miocardico acuto, attualmente, nella necessità di operare in breve tempo e con agevole reperibilità di cellule autologhe, non abbiamo a disposizione altre fonti di terapia cellulare se non quelle midollari.

Tab. 1

Tipo di cellula	Pro	Contro
Staminali Embrionali ES (Embryonic Stem Cells)	Pluripotenzialità Facilmente espansibili	Inducono rigetto Etica discutibile Scarsa disponibilità Potenzialmente tumorigene
Staminali da Cordone Ombelicale USSCs (Unrestricted Somatic Stem Cells)	Multipotenti Discretamente espansibili	Inducono rigetto Scarsa quantità Differenziazione cardiaca incompleta
Progenitori Adulti Multipotenti MAPCs (Multipotent Adult Progenitor Cells) Staminali Ematopoietiche Adulte	Autologhe (assenza di rigetto) Multipotenti Espansibili Autologhe (assenza di rigetto)	Caratterizzazione incompleta Difficile isolamento Differenziazione cardiaca incompleta
HSCs (Hematopoietic Stem Cells)	Multipotenzialità Agevole reperibilità Buona resa quantitativa Discretamente espansibili	Aritmogene
Progenitori Endoteliali Circolanti EPCs (Endothelial Progenitor Cells) Staminali Mesenchimali Adulte MSCs (Mesenchymal Stem Cells) Cellule Staminali Cardiache CSCs (Cardiac Stem Cells)	Autologhe (assenza di rigetto) Agevole reperibilità Discretamente espansibili Autologhe (assenza di rigetto) Multipotenti	Scarsa resa quantitativa Fenotipo non contrattile Caratterizzazione incompleta Scarsa integrazione funzionale Potenzialmente aritmogene Caratterizzazione incompleta Reperibilità non agevole
Cardiomiociti Fetali	Discretamente espansibili Fenotipo contrattile Integrazione strutturale	Assenza di multipotenzialità Inducono rigetto Etica discutibile Sopravvivenza cellulare limitata Mancanza di supporto vascolare
Mioblasti Scheletrici	Autologhe (assenza di rigetto) Agevole reperibilità Buona resa quantitativa Buon potere contrattile	Assenza di multipotenzialità Mancanza di integrazione funzionale Aritmogene Mancanza di supporto vascolare

Ricerca di fonti di cellule staminali

Nella Tabella 1 sono indicati i principali tipi di cellule impiegate sperimentalmente e clinicamente a scopo rigenerativo miocardico nonché i limiti e vantaggi ad esse correlati. Poiché è vasta la letteratura su questo argomento, ho ritenuto più opportuno descrivere in questa revisione alcune osservazioni recenti fatte dal nostro laboratorio ai fini di una miglior identificazione ed isolamento di CS e di promuovere nuove strategie terapeutiche.

Midollo osseo umano

I recenti progressi nella comprensione delle funzioni biologiche delle cellule staminali ed il largo impiego clinico nelle emolinfopatie e in medicina rigenerativa nascondono i limiti nella identificazione morfologica e fenotipica di questa popolazione cellulare. In effetti, non esiste a tutt'oggi specificità nelle metodologie di isolamento, purificazione e caratterizzazione di tali cellule nell'uomo.

Le difficoltà di tipizzazione delle CS umane sono riconducibili alla relativa ridotta quantità di questi elementi cellulari, e al fatto che la maggior parte degli studi fa riferimento all'analisi citofluorimetrica o a indagini in vivo e in vitro che difficilmente riproducono le condizioni fisiologiche in cui queste cellule normalmente operano. Inoltre, non è stato ancora identificato un marcatore antigenico in grado di riconoscere in modo univoco e specifico questa popolazione cellulare. Inaspettatamente, non esistono convincenti studi finalizzati al riconoscimento all'interno del tessuto midollare dell'intera linea differenziativa che, a partire dalla cellula staminale, attraverso progenitori e precursori, porta alla formazione di leucociti, piastrine e emazie.

Per questi motivi abbiamo effettuato uno studio quantitativo morfometrico, morfologico e immunoistochimico su biopsie osteomidollari umane (Figura 1), nel tentativo di caratterizzare l'immunofenotipo delle CS e dei progenitori emopoietici, valutare la loro incidenza in condizioni fisiologiche e patologiche, nonché l'eventuale identificazione di siti di accumulo preferenziale. Non abbiamo analizzato le cellule staminali mesenchimali (BM-MSCs), pur essendo a conoscenza della loro rilevanza biologica e clinica, per la notevole difficoltà della loro identificazione a livello tissutale. Le BM-MSCs hanno per definizione l'intrinseca capacità di differenziare in multiple linee cellulari (osso, grasso, cartilagine, muscolo) ed più raramente verso cellule di origine non mesodermica. Come descritto successivamente in un altro capitolo (Cuore Umano), risulta più agevole invece studiare la loro capacità di crescita e differenziativa in vitro, per comprendere il ruolo che queste cellule possono avere in campo trapiantologico.

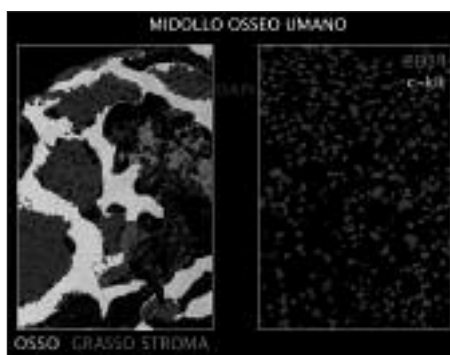
Come marcatori antigenici di cellule staminali emopoietiche abbiamo selezionato c-kit, il recettore per lo stem cell factor e CD34, comunemente impiegato per la selezione di CS in ambito trapiantologico umano. La valutazione della concomitante espressione di questi antigeni con marcatori delle diverse linee differenziative emopoietiche ci ha permesso di definire compartimenti maturativi più avanzati costituiti da progenitori e precursori. In particolare, veniva definita come *Lin^{neg}*

(lineage negative) una cellula staminale che esprimesse solo uno dei due marcatori in assenza di mieloperossidasi (MPOX), Glicoforina A, FVIII, CD20 e CD3. L'analisi della popolazione di cellule *c-kit^{pos} Lin^{neg}* evidenziava che nei midolli studiati la loro densità era di 0,310,14/mm² di tessuto. Questo valore corrisponde a 2,72±2,68 cellule *c-kit^{pos} Lin^{neg}*/10⁵ cellule midollari. La loro distribuzione all'interno dell'emopoiesi era sia in sede paratrabecolare sia sparsa in sede interstiziale. Abbiamo quindi misurato allo stesso modo l'incidenza di cellule *CD34^{pos} Lin^{neg}*. Dall'analisi quantitativa abbiamo escluso gli elementi endoteliali normalmente marcati dal CD34 che comunque coesprimessero il FVIII. Con questi criteri le cellule *CD34^{pos} Lin^{neg}*, avevano una densità di 10,326,18/mm² cui corrisponde un valore di 89,4±52,1/10⁵ cellule midollari. Il valore quantitativo di elementi *CD34^{pos}* risultava 33-volte superiore al numero di cellule *c-kit^{pos}*, suggerendo che quest'ultimo marker di staminalità sia più specifico per individuare cellule multipotenti.

Mediante immunofluorescenza si è potuto ricercare la coespressione di *c-kit* e CD34 al fine di identificare popolazioni cellulari primitive che possedessero due antigeni fondamentali nella caratterizzazione fenotipica degli elementi staminali. In questo modo abbiamo osservato che, nel tessuto emopoietico, erano presenti cellule linfocito-simili *c-kit^{pos} CD34^{pos}* (Figura 1). Quantitativamente, il 43,5% delle cellule *c-kit^{pos}* esprimeva CD34 mentre solo il 25,1% degli elementi *CD34^{pos}* esprimeva *c-kit* confermando l'osservazione che nella scala gerarchica le cellule *c-kit^{pos}* rappresentano una popolazione più primitiva. La densità di queste cellule era di 0,13±0,07/mm², rappresentando una concentrazione di 1,1±0,9 cellule *c-kit^{pos} CD34^{pos}*/10⁵ cellule midollari.

Successivamente, seguendo la cascata differenziativa, ci siamo posti il quesito di quale fosse la frequenza di espressione di CD45 nelle cellule staminali. Con criteri immunofenotipici e morfologici restrittivi, è emerso che solo il 15% delle cellule *c-kit^{pos}* esprimeva CD45, mentre, nell'ambito delle cellule *CD34^{pos}*, il 49% coesprimeva l'antigene leucocitario comune. Ciò significa che, immunofenotipicamente, nel midollo umano esistono cellule staminali non orientate in senso emopoietico, che potrebbero rappresentare una popolazione ancora più indifferenziata e con caratteristiche proprie delle frazioni ripopolante a lungo termine (LTR).

Fig. 1 - Sezione di biopsia osteomidollare umana. Nel pannello di sinistra sono evidenziate le componenti strutturali da pseudocolori ottenuti con microscopia a fluorescenza. Le cellule emopoietiche sono rappresentate dalla reale fluorescenza blu dei nuclei colorati con DAPI. Il pannello di destra mostra due cellule positive per CD34 in fluorescenza rossa, una cellula positiva per *c-kit* in fluorescenza verde ed un elemento che esprime entrambe i marcatori (*c-kit^{pos}/CD34^{pos}*). Si può notare un profilo endoteliale che esprime CD34.



Abbiamo quindi valutato l'espressione di TdT nelle popolazioni staminali nel tentativo di identificare progenitori e precursori dell'emo-linfoiesi. In particolare, si è osservato che, oltre ad elementi $CD34^{pos} TdT^{pos}$, definiti come "ematogeni", erano presenti cellule $c-kit^{pos} TdT^{pos}$. Quantitativamente, il $9.8 \pm 5.6\%$ delle cellule $c-kit^{pos}$ ed il $14.8 \pm 0.1\%$ degli elementi $CD34^{pos}$ coesprimeva a livello nucleare TdT.

In sintesi, nel midollo umano normale sono presenti cellule con caratteristiche fenotipiche di cellule staminali indifferenziate, in cui gli antigeni di superficie $c-kit$ e $CD34$ non sono associati né ai comuni markers di differenziazione eritrogranulo-megacariocitopoietica né ai marcatori più precoci dell'emolinfoiesi. Questi elementi potrebbe essere responsabili localmente del controllo dell'omeostasi midollare ed in sede extramidollare dei fenomeni rigenerativi associati al loro impiego come terapia cellulare delle malattie degenerative.

Placenta umana

La capacità di isolare, espandere, caratterizzare e guidare il differenziamento di cellule staminali ottenute da sedi extramidollari fornisce l'opportunità di individuare nuove sorgenti di cellule rigeneranti e di fattori di crescita specifici per il differenziamento e la proliferazione di queste cellule.

Abbiamo posto la nostra attenzione alla placenta in quanto sede di numerosi fattori di crescita e di diversi tipi di cellule staminali nonché una preziosa fonte di studio di materiale biologico umano considerato di scarto e con ridotta immunogenicità. Cellule con caratteristiche staminali sono state isolate dall'amnios e più recentemente dal liquido amniotico umano e di topo. Tuttavia, inaspettatamente, non esistono convincenti studi finalizzati al riconoscimento morfologico delle cellule staminali all'interno della placenta.

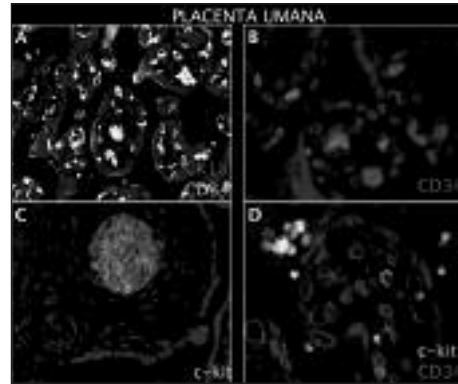
Nella placenta ed annessi fetali sono presenti elementi staminali a livello:

- 1) del cordone ombelicale, il cui sangue è sede di elementi emopoietici già in uso trapiantologico;
- 2) della membrana amniotica e del liquido amniotico da cui sono state isolate cellule multipotenti;
- 3) nel tessuto placentare vero e proprio dove a livello dei villi e dei tralci connettivali sono presenti elementi indifferenziati sia stromali che epiteliali;
- 4) nel sangue della camera intervillosa dove dovrebbero essere presenti elementi staminali simili a quelli riscontrati nel sangue cordonale.

Per questi motivi abbiamo effettuato uno studio morfometrico, morfologico e immunoistochimico su placente umane a termine, nel tentativo di caratterizzare la struttura completa della placenta e l'immunofenotipo delle cellule staminali ai fini di valutare la loro incidenza in condizioni fisiologiche e patologiche, nonché l'eventuale identificazione di siti di accumulo preferenziale.

Come condizione patologica abbiamo al momento studiato placente di pazienti con diabete di tipo I e II. Tra i marcatori antigenici di cellule staminali emopoietiche abbiamo selezionato $c-kit$, il recettore per lo stem cell factor, ABCG2 o Atp-Binding Cassette transporter Gene e $CD34$, comunemente impiegato per la sele-

Fig. 2 - Sezioni di placenta umana a termine. Nel pannello A sono rappresentate sezioni trasverse di villi composti da cellule trofoblastiche positive per citocheratina 18 (CK18, fluorescenza rossa) e da numerosi profili endoteliali marcati da CD34 (fluorescenza verde). In giallo l'autofluorescenza dei globuli rossi. Il pannello B mostra un singolo elemento CD34^{pos} all'intermo di un villo in cui sono riconoscibili profili endoteliali marcati da CD34 (globuli rossi: autofluorescenza arancione). Il pannello C corrisponde ad una sezione di vaso placentare di medio calibro nel cui lume sono evidenziate dalla fluorescenza verde due cellule *c-kit*^{pos} immerse nei globuli rossi autofluorescenti. Il pannello D documenta una cellula *c-kit*^{pos} (fluorescenza verde) negativa per CD34 (fluorescenza rossa) presente nello stroma di un villo ricco in profili endoteliali marcati da CD34. Nei pannelli A, B, C e D la fluorescenza blu corrisponde ai nuclei colorati da DAPI.



zione di cellule staminali emopoietiche in ambito trapiantologico umano. Le cellule con caratteristiche mesenchimali sono invece state identificate con CD44, CD105 e CD90.

La valutazione della concomitante espressione di questi antigeni con marcatori delle diverse linee differenziative può permettere di definire il loro fenotipo indifferenziato ed i compartimenti maturativi più avanzati costituiti da progenitori e precursori.

L'analisi morfometrica ha evidenziato che nelle placente normali il numero e le dimensioni dei villi e del loro stroma vascolare si dispone con un gradiente dalla porzione fetale verso quella deciduale o materna. Tale gradiente viene significativamente alterato dal diabete indicando che esiste un riarrangiamento delle componenti strutturali della placenta durante i 9 mesi di iperglicemia.

Abbiamo potuto documentare che esistono nella placenta umana cellule *c-kit*^{pos}/*CD34*^{neg}/*Ck18*^{neg} (Figura 2) indicando un fenotipo indifferenziato privo di marcatori, rispettivamente, della linea emopoietica e vascolare nonché di quella trofoblastica del villo. La predominanza di queste cellule era riscontrabile all'interno dei vasi del villo ma erano presenti in alcune porzioni della placenta sedi di accumulo in forma di clusters addossati allo stroma placentare. Inoltre abbiamo osservato la presenza di queste cellule nel sangue ombelicale su sezioni di vasi cordonali (Figura 2). Le cellule *c-kit*^{pos} risultavano ridotte di incidenza nelle placente di diabete gravidico confermando l'ipotesi che le alterazioni metaboliche legate al diabete possono essere lesive per i compartimenti staminali di un tessuto. Questa osservazione può avere una rilevanza notevole se si considera che la placenta ha tra le funzioni principali proprio quella di regolare l'omeostasi metabolica.

I dati preliminari indicano inoltre che l'indice proliferativo cellulare è significativamente modificato nelle placente di donne diabetiche suggerendo che si verifichi già durante il periodo fetale un importante riarrangiamento cellulare e strutturale a seguito di questa malattia.

Parallelamente abbiamo messo a punto l'isolamento ed espansione di cellule ottenute dalla digestione di frammenti di placenta. Dalla caratterizzazione immunofenotipica con citofluorimetria e dall'analisi in vitro è emersa l'esistenza di almeno due linee cellulari. Una con fenotipo e crescita tipiche delle cellule staminali mesenchimali e l'altra Ck18^{pos} dotata di minore espansibilità. Il profilo di espressione genica della linea mesenchimale mostrava un notevole grado di multipotenzialità che veniva confermata dall'analisi immunocitochimica.

Queste osservazioni possono dare un contributo ad una migliore identificazione delle cellule staminali nel tessuto placentare e di conseguenza ad un possibile loro impiego in campo clinico-terapeutico. Inoltre, gli effetti del diabete o di altre condizioni patologiche legate alla gravidanza possono essere maggiormente approfondite dalla conoscenza dei compartimenti cellulari che regolano l'integrità strutturale e funzionale della placenta.

Cuore umano

I nostri più recenti risultati fanno intravedere la possibilità di una nuova forma di terapia cellulare nell'uomo. Infatti, cellule staminali cardiache (CSC) umane, isolate e clonate a partire da piccoli frammenti bioptici successivamente espansi in vitro, possono essere somministrate autologamente e favorire la ricostituzione di tessuto miocardico morto o cicatriziale arrestando l'inevitabile, sfavorevole evoluzione dell'infarto miocardico verso l'insufficienza cardiaca. Analoghi importanti benefici potrebbero essere ottenuti in casi di insufficienza cardiaca avanzata, allorché la sostituzione dei miociti fortemente ipertrofici e con capacità funzionale modesta con nuovi, più efficienti miociti e vasi potrebbe interferire positivamente sul processo evolutivo verso le fasi terminali dello scompenso.

Nel cuore dell'uomo esiste una sottopopolazione di cardiomiociti proliferanti che aumenta in condizioni patologiche. Nell'ipotesi che queste cellule rappresentino miociti amplificanti originati da elementi indifferenziati, abbiamo cercato di stabilire le condizioni ottimali di isolamento ed espansione di potenziali progenitori ottenuti da piccoli frammenti di miocardio umano (Figura 3). In questo modo abbiamo identificato una cellula staminale cardiaca che esprime come marcatore di superficie c-kit automantenentesi, clonogenica e multipotente. Le cellule

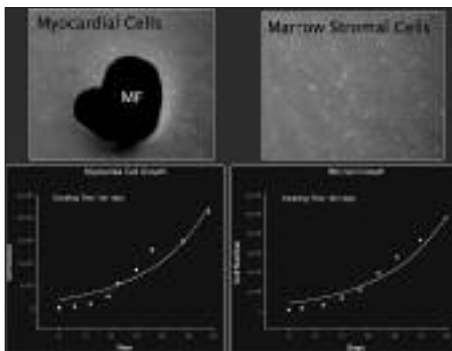
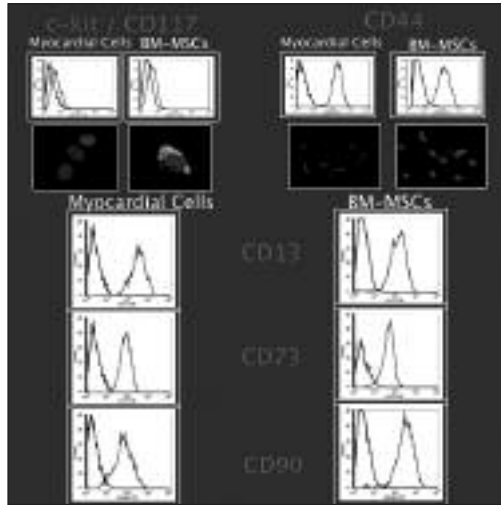


Fig. 3 - Colture primarie di cellule ottenute da miocardio (myocardial cells) e da midollo (marrow stromal cells) umano. Sono rappresentate la simile morfologia in contrasto di fase (pannelli superiori) e cinetica (pannelli inferiori) di crescita dei due tipi di cellule in coltura. MF= frammento di miocardio.

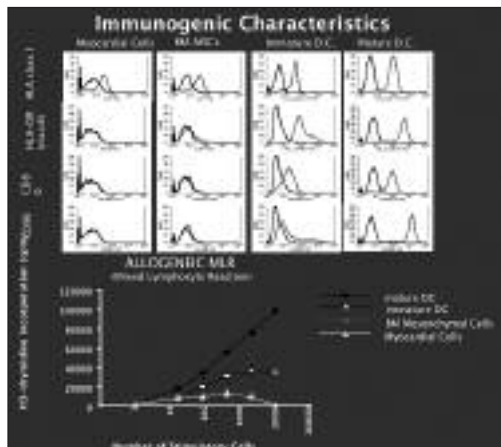
Fig. 4 - Illustrazione rappresentativa delle caratteristiche immunofenotipiche delle colture cellulari ottenute da cuore (myocardial cells) e midollo (BM-MSCs) umano. Mediante citofluorimetria ed immunocitochimica una piccola frazione di cellule risulta c-kit^{pos} (1-2%) mentre una larga percentuale risulta CD44^{pos} (90%) in entrambe le colture. Simili elevati valori di espressione di CD13, CD73 e CD90, marcatori “mesenchimali”, sono riscontrabili in citofluorimetria per le cellule miocardiche e midollari.



espansive in coltura hanno caratteristiche morfologiche ed esprimono antigeni di superficie comunemente riscontrabili nelle cellule staminali mesenchimali midollari (Figura 4).

Abbiamo infatti confrontato le proprietà delle cellule ottenute da cuore umano con quelle di cellule mesenchimali (BM-MSCs) ottenute dal midollo dello stesso paziente al momento dell'intervento cardiocirurgico. Da questo studio è emerso che le due popolazioni avevano simili modalità di crescita e simili caratteristiche immunofenotipiche anche se abbiamo documentato un differente potenziale cardiogenico in vitro. È stato interessante notare come le cellule primitive miocardiche avessero proprietà immunogeniche simili a quelle delle BM-MSCs (Figura 5) suggerendo un loro impiego prospettico in condizioni eterologhe di trapianto. Abbiamo inoltre verificato che una volta iniettate nel miocardio infartuato di ratti e topi immunosoppressi, queste cellule staminali mesenchimali rigenerassero car-

Fig. 5 - Immagine illustrativa delle proprietà immunogeniche delle colture di cellule cardiache (myocardial cells) e midollari (BM-MSCs). Le cellule miocardiche e midollari hanno simili livelli di espressione di HLA di classe I e mancata espressione di HLA di classe II, CD80 e CD86. Entrambe i tipi di cellule non determinano reazione di linfociti allogenici in co-cultura. Tutti questi parametri sono stati confrontati con cellule dendritiche (D.C.) immature e mature.



diomiociti e vasi coronarici. Le colture delle cellule staminali cardiache dalla loro iniziale propagazione dai frammenti di miocardio all'impianto negli animali infartuati veniva eseguita con minimo impiego di prodotti animali. Quindi, da piccoli frammenti di cuore umano è possibile isolare ed espandere cellule primitive con caratteristiche mesenchimali ad importante impronta cardiogenica.

Identificazione delle nicchie di cellule staminali cardiache

Negli organi che si automantengono, le nicchie rappresentano regioni protette dell'interstizio che contengono gruppi di cellule staminali e progenitori precoci. Le cellule di supporto sono una componente fondamentale della nicchia; queste, infatti, ancorano le cellule staminali alla nicchia e modulano la loro attivazione, migrazione e differenziazione attraverso l'espressione e la localizzazione selettiva di proteine di giunzione ed adesione comprendenti le connesine e le caderine.

Cuore murino

Abbiamo recentemente dimostrato che le CSC e progenitori precoci (Early Committed Cells, ECC) sono raggruppati in nicchie negli atri del cuore adulto di topo. Tuttavia non abbiamo identificato le cellule di supporto delle nicchie di CSC. Per questo motivo, abbiamo dapprima documentato con Western blot che CSC-ECC isolate esprimono connessina 43, connessina 45, N-cadherin e E-cadherin. Abbiamo eseguito un test funzionale per caratterizzare il ruolo delle connesine nella formazione delle gap junctions tra CSC-ECC e cellule di supporto, miociti e fibroblasti. Abbiamo studiato il coupling del colorante alla calceina con il microscopio a due fotoni dopo perincubazione delle cellule con il colorante fluorescente. Le cellule primitive fluorescenti venivano quindi piastrate con miociti e fibroblasti. La calceina era traslocata dalle CSC-ECC ai miociti e ai fibroblasti nelle colture indicando che questi due tipi cellulari possono rappresentare cellule di supporto. Lo studio immunostochimico con microscopio confocale di questi preparati in vitro dimostrava che tra CSC-ECC e miociti e fibroblasti era presente connessina 45 e 43. Analoga localizzazione era presente per N-cadherin e E-cadherin. È importante sottolineare che connessina 43, connessina 45, N-cadherin e E-cadherin erano costantemente trovate nelle nicchie atriali tra due CSC, una CSC e una ECC, o tra due ECC. Le connesine e le caderine si ritrovavano tra CSC-ECC e miociti o fibroblasti. Quindi, i miociti ed i fibroblasti sono parte integrante delle nicchie di CSC e funzionano da supporto delle CSC-ECC. Questa organizzazione cellulare delle nicchie di CSC dimostra ulteriormente che il cuore è un organo capace di automantenimento.

Cuore fetale umano

Più recentemente abbiamo ricercato la presenza di nicchie di CSC nel cuore umano. Il cuore fetale per dimensioni e intensa capacità di crescita iperplastica offre l'unica opportunità di studiare in toto la distribuzione delle cellule primiti-

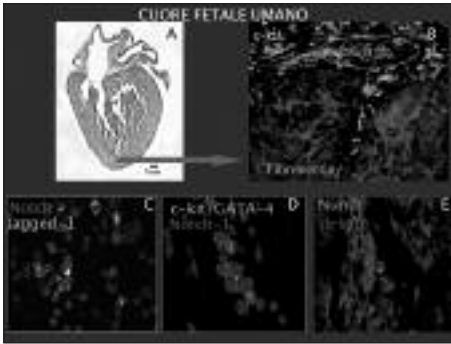


Fig. 6 - Cuore fetale umano. Il pannello A rappresenta una sezione sagittale di cuore fetale alla 22^o settimana di gestazione. Il pannello B illustra un cluster di cellule *c-kit*^{pos} (fluorescenza gialla) immerse in una maglia di fibronectina (fluorescenza verde) presente nella zona apicale del cuore fetale. La fluorescenza rossa mostra i fasci di cardiomiociti evidenziati dalla fluorescenza rossa di actina muscolare sarcomerica. Nei tre pannelli inferiori si documenta come i regolatori di stemness e differenziazione siano presenti nelle cellule di cuore fetale umano. Pannello C: associazione di Notch-1 (fluorescenza rossa) con il suo ligando Jagged-1 (fluorescenza verde); Pannello D: cluster di 11 cellule che esprimono

sulla superficie *c-kit*^{pos} (fluorescenza verde) di cui 2 mostrano GATA-4 a livello nucleare (fluorescenza turchese). Notch-1 (fluorescenza rossa) è presente in una cellula *c-kit*^{pos} ed in 8 cellule *c-kit*^{pos} che compongono il cluster. Pannello E: nel contesto di fasci muscolari (actina sarcomerica: fluorescenza rossa) si evidenzia una cellula che mostra positività polare di NUMB.

ve nel miocardio umano (Figura 6). Abbiamo pertanto quantificato le cellule staminali e la loro progenie nel cuore alla 20 settimana di sviluppo impiegando *c-kit* come marcatore di superficie di staminalità.

Abbiamo potuto documentare che le popolazioni staminali avevano una distribuzione differente nelle varie porzioni del cuore con predominanza di cellule *c-kit*^{pos} *lin*^{neg} nella giunzione a-v e nell'apice che sono notoriamente sedi di basso carico di lavoro (Figura 6). Nelle zone prossimali alla base del cuore ed in sede epicardica abbiamo osservato un accumulo di progenitori e precursori cardiaci suggerendo che la miocardiogenesi avviene in sedi specifiche del cuore umano in questa fase di sviluppo. Poiché era frequente la formazione di clusters, che mimica la proprietà fondamentale delle CS di raccogliersi in nicchie, abbiamo studiato a livello tissutale con immunohistochimica l'espressione di NUMB, di β -catenina come esecutore della via di trasduzione di Wnt, nonché il sistema Jagged/Notch (Figura 6). Infine, erano presenti nel miocardio fetale cellule che esprimevano recettori per HGF, EGF, VEGF e SDF-1 indicando che diversi fattori di crescita e chemochine partecipano allo sviluppo del cuore umano.

Conoscere le sedi di accumulo, la distribuzione e la regolazione della attivazione e differenziazione delle popolazioni primitive residenti del cuore umano può contribuire sostanzialmente alla comprensione dei meccanismi cellulari della patologia cardiaca e ad incidere in modo patogenetico sulla terapia delle cardiopatie.

Fattori di crescita

Il nostro ed altri gruppi di ricerca hanno dato un contributo all'osservazione che virtualmente sono presenti cellule staminali in tutti i tessuti dove sono deputate al mantenimento dello specifico turnover cellulare. Nel cervello e nel cuore, che possiedono un basso turnover cellulare, la possibilità di rimpiazzare rapidamente cellule perse potrebbe essere fortemente ridotta.

Si aprono pertanto importanti quesiti:

- 1) È necessario ricorrere a cellule staminali non appartenenti allo stesso organo da riparare?
- 2) La base cellulare dell'insufficienza d'organo risiede nelle popolazioni staminali?
- 3) Le cellule staminali midollari o circolanti hanno un ruolo primario nel mantenere l'omeostasi cellulare di diversi organi?
- 4) Quali sono i fattori di crescita che controllano la funzione, il numero, la migrazione e l'annidamento delle cellule staminali?

Attualmente abbiamo rivolto l'attenzione a questi quesiti focalizzando i nostri studi sull'individuazione delle popolazioni primitive presenti nel cuore nonché del loro ruolo nelle patologie cardiovascolari. Parte di questi studi è stata pubblicata mentre altri importanti avanzamenti sono ancora in fase di revisione scientifica. In questa ottica, semplicemente iniettando nel miocardio infartuato di topi, ratti e cani fattori di crescita (HGF e IGF-1) siamo riusciti ad attivare e traslocare cellule staminali dai loro siti di accumulo verso l'area infartuale e rigenerare il miocardio. Si apre quindi una nuova strategia terapeutica che sfrutta il potenziale riparativo residente per curare le malattie degenerative.

Il cuore rappresenta uno degli organi fondamentali per l'azione del GH e risulta sempre più importanti le evidenze sperimentali e cliniche del ruolo chiave giocato dal sistema GH/IGF-1 nella regolazione della struttura e funzione dell'apparato cardiovascolare. La carenza o eccesso di GH nell'adulto determinano infatti patologie cardiache talmente importanti sul piano clinico da condizionare non solo la qualità ma anche la durata della vita dei pazienti. Si conosce dalla letteratura che la somministrazione di GH in pazienti cardiopatici aumenta lo spessore della parete e normalizza la performance cardiaca. È interessante notare che, in modelli di cardiomiopatia dilatativa, il GH è in grado di aumentare lo spessore della parete ventricolare attivando la crescita della massa muscolare senza nessun cambiamento del connettivo e della densità capillare. Inoltre, il GH induce un rimodellamento ventricolare favorevole in cui la risposta di crescita è associata a cambiamenti non significativi del volume della camera e mantenimento della performance contrattile. Esistono rari studi sulla risposta cellulare miocardica al GH in pazienti cardiopatici con deficit funzionale cui veniva somministrato l'ormone per via sistemica. Veniva dimostrato in questi casi un effetto positivo sulla performance cardiaca associato a livello istologico ad un miglior assetto delle miobrille.

Nel cuore del topo, il sistema IGF-1-IGF-1 recettore induce proliferazione delle cellule staminali cardiache, aumenta l'attività telomerasica, attenua la senescenza replicativa e preserva il pool funzionalmente competente delle cellule staminali. Recentemente sono emersi studi sull'uomo e sull'animale che hanno documentato come il GH aumenti il numero di cellule staminali emopoietiche e che pazienti con forte riduzione della riserva midollare da chemioterapia risentono positivamente della somministrazione di GH aumentando la quantità di cellule staminali e progenitori. Non esistono tuttavia osservazioni nell'uomo sull'effetto dell'ormone sulla funzione e numero delle popolazioni primitive cardiache responsabili dei meccanismi rigenerativi.



Fig. 7 - Sezioni trasversali di ventricolo sinistro di cuori infartuati di topi non trattati (MI-U) o trattati con iniezione sistemica di GH (MI-GH) per 7 giorni. Le teste di freccia indicano il miocardio risparmiato dall'infarto all'interno della porzione necrotica del ventricolo. Si può apprezzare un aumento dello spessore della parete con maggior risparmio di tessuto nel cuore trattato con GH. La tabella indica i dati quantitativi del bilancio cellulare nel modello sperimentale.

Per questi motivi abbiamo eseguito studi sperimentali finalizzati a dimostrare rigenerazione miocardica impiegando GH. Nel topo, il trattamento con iniezione intraperitoneale di GH, iniziato a poche ore dall'induzione di infarto e per i 7 giorni successivi, era in grado di proteggere il cuore dal danno ischemico e di favorire la rigenerazione del tessuto cardiaco. Infatti, in assenza di sostanziali modificazioni delle dimensioni anatomiche, a seguito di somministrazione di GH la crescita della massa cardiaca risultava maggiore della dilatazione della camera ventricolare. Il GH riduceva le dimensioni dell'infarto diminuendo l'accumulo di collagene, la perdita cellulare e favorendo la generazione di nuovo miocardio e riducendo la morte apoptotica (Figura 7). Inoltre, il GH aumentava il pool di cellule proliferanti nel miocardio infartuato ed il numero di cellule staminali nelle diverse porzioni del miocardio.

Nell'insieme i nostri dati indicano che, stimolando le popolazioni primitive del miocardio, si può ridurre il danno ischemico a seguito di occlusione della coronaria. Inoltre, l'impiego sistemico di fattori di crescita può essere preso in considerazione nella scelta di approcci rigenerativi delle patologie d'organo.

Conclusioni

A tutt'oggi non esistono ricerche in cui sia stato effettuato un confronto diretto tra le diverse modalità di trattamento dell'infarto miocardico al fine di promuovere processi di rigenerazione cellulare a scopo riparativo, in termini di ripristino funzionale. In molti casi sono stati ottenuti risultati promettenti ma solo raramente il miglioramento delle prestazioni funzionali cardiache era associato all'integrazione strutturale e funzionale dell'impianto di cellule staminali di diversa origine con il tessuto miocardico del cuore ricevente. Tuttavia, malgrado l'intenso lavoro svolto da numerosi gruppi di ricerca, la forma più appropriata di terapia cellulare per la riparazione di un danno miocardico resta ancora da stabilire e la domanda fondamentale di quale sia la cellula o la modalità migliore per raggiungere questo scopo è ancora senza risposta. Ci sono tuttavia forti indicazioni

per ritenere che la via preferenziale debba essere rivolta alla identificazione di una autentica cellula progenitrice cardiaca che possa essere indotta a migrare verso le zone miocardiche destinate ad essere riparate, da opportuni segnali che siano anche in grado di determinarne la proliferazione e l'appropriata differenziazione. Ci si deve, infatti, attendere che cellule con queste caratteristiche siano più efficienti rispetto ad altre nel promuovere la rigenerazione miocardica, essendo programmate a costituire specifiche strutture cardiache. Inoltre, le reazioni di crescita di queste cellule dovrebbe essere immediata consentendo una pronta risposta al trattamento e quindi un pronto ripristino della massa e della funzione cardiaca. Infine la dibattuta questione della transdifferenziazione di cellule ottenute da altri tessuti sarebbe evitata così come la necessità di controllare eventuali processi di rigetto che costituiscono notevoli limiti quando si fa ricorso ad una terapia cellulare eterologa.

Alla luce di queste considerazioni, per una cura dell'infarto miocardico mediante cellule staminali anche nel lungo termine sembra intuitivamente molto indicato valutare primariamente la potenzialità terapeutica delle CSC facendo ricorso a procedure che prevedano una mobilizzazione delle cellule verso la regione miocardica lesa e/o, dopo opportuno isolamento e preparazione di CSC autologhe e/o singeniche, una loro iniezione diretta nella stessa regione. Approcci analoghi si potrebbero applicare per tutte le forme di malattia cardiaca di carattere degenerativo per le quali si possano prevedere finalità terapeutiche mediate dall'attivazione di meccanismi di rigenerazione risultanti in processi riparativi. Nei cuori rigenerati resterà successivamente da definire quale bilancio si stabilisce tra i processi di morte e di proliferazione cellulare e in quale misura il nuovo miocardio è in grado di acquisire le caratteristiche del tessuto miocardico maturo, in termini di competenza funzionale meccanica ed elettrica a livello di organo, di tessuto e dei singoli miociti.

Per tutti questi motivi, si impone la ricerca di una terapia dell'insufficienza cardiaca basata sulla comprensione dei meccanismi cellulari responsabili della malattia e sulla identificazione di una terapia cellulare individualizzata per singola patologia e singolo paziente.

Bibliografia

1. Primitive cells and tissue regeneration. *Circ Res.* 2003; 92: 579-582.
2. Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature.* 2002; 415: 240-243.
3. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation.* 2002; 106: 3009-3017.
4. Bailo M, Soncini M, Vertua E, Bonassi Signoroni P, Sanzone S, Lombardi G, Arienti D, Calamani F, Zatti D, Paul P, Albertini A, Zorzi F, Cavagnini A, Candotti F, Wengler GS, Parolini O. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. *Transplantation* 2004; 78 (10): 1439-1448.

5. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004; 428: 668-673.
6. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2001; 344: 1750-1757.
7. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003; 114: 763-776.
8. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. 2001; 105: 829-841.
9. Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. Infarct remodelling after intracoronary progenitor cell treatment in patient with acute myocardial infarction (TOP-CARE AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2003; 108: 2212-2218.
10. Cayourette M, Raff M. Asymmetric segregation of Numb: a mechanism for neural specification from *Drosophila* to mammals. Review article. *Nature Neuroscience* 2002; 5: 1265-1269.
11. De Coppi P, Bartsch GJ, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology* 2007; Advance online publication, January 7.
12. Fagnoni FF, Oliviero B, Giorgiani G, De Stefano P, Deho A, Zibera C, Gibelli N, Maccario R, Da Prada G, Zecca M, Locatelli F. Reconstitution dynamics of plasmacytoid and myeloid dendritic cell precursors after allogeneic myeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2004; 104: 281-289.
13. Fleming WH, et al. Converging roads: evidence for an adult hemangioblast. *Exp Hematol*. 2003; 31: 987-993.
14. Hurlston AF, Haramis APG, Wienholds E, Beghtel H, Korving J, Van Eden F, Cuppen E., Zivckovitch D, Plasterk RHA, Clevers H. The wnt/ β catenin pathway regulates cardiac valve formation. *Nature* 2003; 425: 633-637.
15. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418: 41-49.
16. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, Kim YJ, Soo Lee D, Sohn DW, Han KS, Oh BH, Lee MM, Park YB. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004; 363: 751-756.
17. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nature Medicine* 2000; 6: 1282-1286.

18. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001; 357: 279-280.
19. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004; 428: 664-668.
20. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 12313-12318.
21. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001; 410: 701-705.
22. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 10344-10349.
23. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*. 2003; 107: 2294-2302.
24. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284: 143-147.
25. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997; 276: 71-74.
26. Quaini F, Cigola E, Lagrasta C, Saccani G, Quaini E, Rossi C, Olivetti G, Anversa P. End stage cardiac failure in humans is coupled with the induction of proliferating cell nuclear antigen and nuclear mitotic division in ventricular myocytes. *Circ. Res*. 1994; 75, 1050-1063.
27. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*. 2002; 346: 5-15.
28. Rosenzweig A. Cardiac cell therapy- Mixed results from mixed cells. Editorial *N Engl J Med*. 2006; 355: 1274-1277.
29. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001; 414: 98-104.
30. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienamber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone marrow stem cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45-46.
31. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kosterling M, Hernandez A, Sorg RV, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002; 106: 1913-1918.
32. Torella D, Rota M, Nurzynska D, Musso E, Monsen A, Shiraishi I, Zias E, Walsh K, Rosenzweig A, Sussman MA, Urbanek K, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Anversa P, Leri A. Cardiac Stem Cell and Myocyte Aging, Heart Failure, and Insulin-Like Growth Factor-1 Overexpression. *Circ Res*. 2004; 94: 514-524.
33. Tsakonas SA, Rand MD, Lake RJ. Notch signalling: cell fate control and signal integration in development. Review article. *Science* 1999; 284, 770-776.
34. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*. 2003; 361: 47-49.

35. Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 10440-10445.
36. Urbanek K, Rota M, Cascapera S, Bearzi C, Nascimbene A, De Angelis A, Hosoda T, Chimenti S, Baker M, Limana F, Nurzynska D, Torella D, Rotatori F, Rastaldo R, Musso E, Quaini F, Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ Res* 2005; 97: 663-673.
37. Urbanek K, Cesselli D, Rota M, Nascimbene A, De Angelis A, Hosoda T, Bearzi C, Boni A, Bolli R, Kajstura J, Anversa P, Leri A. Stem cell niches in the adult mouse heart. *PNAS*; 2006, 103: 9226-9231.
38. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004; 364: 141-148.
39. Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, Hanley A, Scadova H, Qin G, Cha DH, Johnson KL, Aikawa R, Asahara T, Losordo DW. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2005; 115: 326-338.

The therapeutic plasticity of neural stem/precursor cells in multiple sclerosis

Stefano Pluchino, Gianvito Martino

Neuroimmunology Unit, DIBIT and Institute of Experimental Neurology,
San Raffaele Scientific Institute, Milan

The endogenous stem cell compartment of the adult brain

The adult mammalian central nervous system (CNS) harbours low numbers of multipotent stem and precursor cells within certain specialised tissue compartments defined '*germinal niches*' (1). These cells display cardinal features such as unlimited capacity for self-renewal, indefinite ability to proliferate in response to mitogens, and multipotency for the different neuroectodermal lineages of the CNS (2). Self-renewal and differentiation of stem and precursor cells are non-cell autonomous processes that are regulated by the specialized microenvironment of the germinal niche, in which these cells reside. Within the niche, both environmental cues and intrinsic genetic programs are required to direct/regulate stem and precursor cell proliferation and differentiation (1).

The subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricle wall and the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus (DG) of the hippocampus are the two major germinal regions of the adult mammalian brain (Figure 1).

In the SVZ, cells with structural and molecular characteristics of astrocytes are the true stem cells (SVZ astrocyte or type-B cells) (3-5). They are immunoreactive for the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and lie in intimate contact with the other cells of the SVZ niche, the so called type-C cells (or transit-amplifying neuronal progenitors) and type-A cells (or lineage-committed migratory neuroblasts). The usual cell lineage differentiation pathway goes from the GFAP+ type B cell, through an intermediate GFAP+/distal-less homeobox (Dlx) 2+ type C cell, to GFAP-/Dlx2-/Doublecortin+/neural cell adhesion molecule (NCAM)+ migratory neuroblast (3). In the SGZ, GFAP/Nestin-expressing astrocytes function as stem cells (type B cells), undergo self-renewal, proliferation and differentiation into transit amplifying doublecortin-expressing type D cells, which then differentiate further into lineage-committed migratory granule neurons (type G cells, immunoreactive for calbindin) (6, 7). The maintenance and differentiation of neural stem and precursor cells in brain germinal niches depends on their physical con-

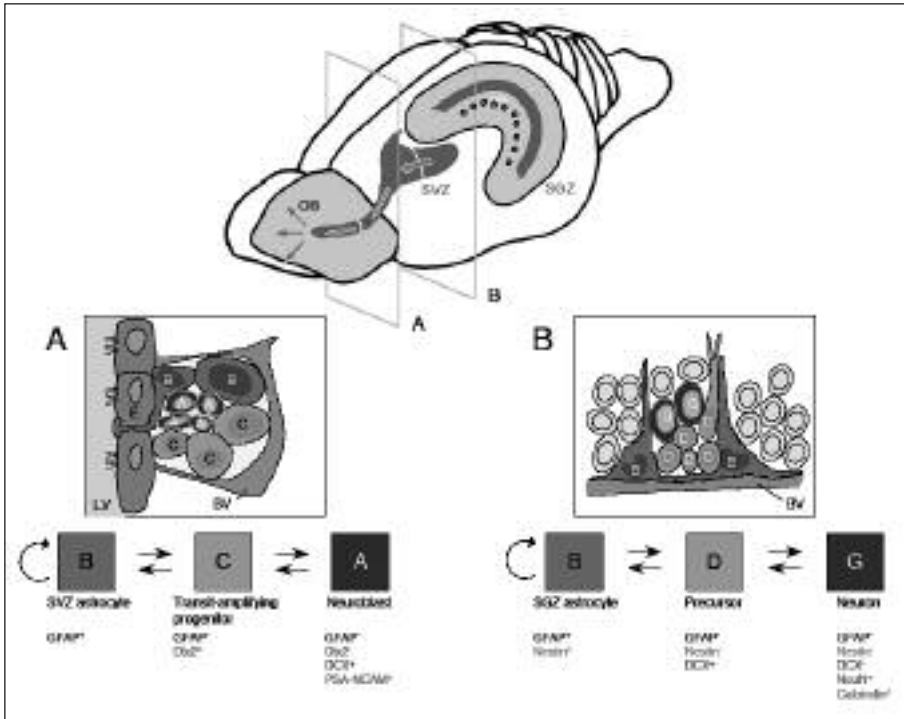


Fig. 1 - Relationship between the three classes of adult neural stem and precursor cells (NPCs) in the two major germinal niches of the adult mammalian brain, which are located in the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles (A) and in the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus (DG) of the hippocampus (B). Blue arrows indicate cell migration pathways, while green arrows indicate cell differentiation pathways.

tact to the basal lamina that - acting as a scaffold - sequesters and/or modulates the release of discrete amounts of cytokines, growth factors and/or stem cell regulators, all released from local cells (e.g., fibroblasts, macrophages and pericytes) (8).

The brain repairs itself

In the early 20th century, the seminal work of Francisco Tello showed that the CNS has the ability to regenerate itself after an injury. This observation has been recently rejuvenated by detailed *in vitro* and *in vivo* mechanistic evidence supporting the existence of an innate self-maintenance program, 'the brain repair system', sustaining tissue homeostasis and repair (9). The dissection of the molecular and cellular events sustaining intrinsic brain repair mechanisms might provide an attractive conceptual framework to foresee more efficacious therapies for neurological diseases.

Several molecular and cellular events sustaining intrinsic brain repair mechanisms have been described so far. They can be divided into three distinct, although strictly interrelated, categories.

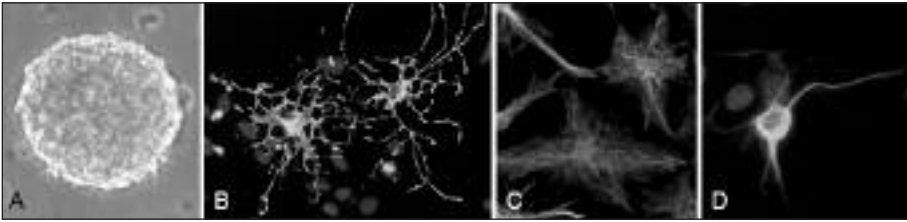


Fig. 2 - In vitro characteristics of NPCs used for transplantation in CNS demyelinating disorders. Upon growth factor withdrawal, NPCs - grown in vitro as free-floating neurospheres (A, phase contrast) - give rise to progeny containing variable percentages of oligodendrocytes (B, Galactocerebroside (GalC)), astrocytes (C, glial fibrillary acidic protein (GFAP)) or neurons (D, beta-tubulin-III). Nuclei in B-D have been counterstained with dapi (blue). Magnification 40 X.A

- 1) Inflammatory-driven processes may concur to brain repair owing to the fact that humoral and cellular inflammatory components may shift sense (function) over time from a tissue-damaging mode to a mode promoting tissue repair (e.g. neurotrophic support from inflammatory cells);
- 2) Brain plasticity - the recruitment of alternative “non-damaged” functioning neuronal pathways (cortical maps) mainly via axonal branching and synaptogenesis - occurs as a consequence of brain damage. Whether or not and to what extent recapitulation of developmental pathways is the underlying phenomenon sustaining brain plasticity is still matter of investigation;
- 3) Endogenous adult neural stem/precursor cells - able to survive to the inflammatory and/or degenerative insult - are capable to migrate within damaged areas and promote repair via several mechanism of action (e.g. cell replacement, remyelination, neuroprotection) (10). It is still a matter of debate whether or not brain repair can occur as a consequence of the recruitment within the CNS of transdifferentiating stem cells of a different embryonic origin (e.g. developmental plasticity vs. cell fusion).

Brain repair spontaneously occurs in MS. The most challenging example sustaining this assumption comes from autopsy or biopsy studies showing that almost 40% of MS lesions show evidence of remyelination (11). Oligodendrocyte precursors (OPCs) play an unquestionable role in promoting remyelination but there are data indicating that this is not the sole and exclusive cell-mediated mechanism underlying remyelination in MS (12). Owing to their ability to support neurogenesis and gliogenesis during adulthood (13), endogenous neural stem and precursor cells [thereafter referred as adult neural precursor cells (NPCs)] might also contribute to remyelination in MS. In experimental models of chronic inflammatory multifocal demyelinating disorders such as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the animal model of MS, mitotically active progenitor cells, residing within either in the SVZ of the brain or the subependymal layer of central canal of the spinal cord, subvert their physiological destiny - the longitudinal migration along the rostral migratory stream (RMS) to the olfactory bulb (OB) or the radial migration to the lateral columns of the spinal cord, respectively - and migrate into areas of demyelination where they differentiate into glial

cells (14, 15). Further, a four-fold increase of the number of type B cell-derived oligodendrocytes expressing the platelet-derived growth factor (PDGF) receptor α and the oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (Olig2) is observed as a consequence of the occurrence of a single demyelinating lesion within the corpus callosum (16). However, although accumulating evidence indicates that endogenous gliogenesis - driven by either OPCs and/or NPCs - may occur as part of an 'intrinsic' self-repair process during inflammatory demyelination, there are no convincing explanations about the overall incapacity of the endogenous stem/precursor cell compartment in promoting full and long-lasting CNS repair in MS.

We have recently proposed that inflammation might derange the appropriate temporal and spatial relationship(s) between cells residing within the SVZ, leading to prevalence of type B stem cells undergoing terminal symmetrical cell division and might then explain the failure of remyelination at least in periventricular demyelinating MS lesions (10). Experimental and human studies support such hypothesis. Inflammatory demyelinating lesions are frequently visible in MS through the lateral ventricular lining as elongated grey sleeves, are closed to subependymal veins, and are very often associated to a granular ependymitis. These lesions usually appear as wedged-shaped in coronal sections with a broad base toward the ventricles (17). Moreover, although complete remyelination is present in some periventricular demyelinating MS lesions, the global extent of remyelination is lower in these lesions, when compared to lesions located in the deep white matter or subcortically (11). MRI of human MS parallels this histological evidence as gadolinium (Gd) enhancement (highly suggestive of site-specific inflammation) in T1-weighted images, as well as hyperintense T2-weighted lesions, are frequently visible within the periventricular brain region. Moreover, spatial mapping of T2 and Gd-enhancing T1 lesion volumes in MS suggests that a proportion of the periventricular T2 lesion volume may arise from mechanisms other than those associated with early breakdown of the bloodbrain barrier leading to T1 Gd enhancement. This discrepancy of T1/T2 lesion distribution includes the possibility that the central white matter might have a greater susceptibility to persistent T2 hyperintense changes following inflammation (18). During sub-acute LPS-induced brain inflammation, interleukin (IL)-6 released by microglia significantly impairs neurogenesis in the hippocampus *in vivo*. However, the impairment is fully restored when nonsteroidal anti-inflammatory drugs (such as indomethacin) are given (19). *In vitro* generation of new neurons and oligodendrocyte from NPCs is induced and supported by mouse microglia that have encountered T cell-associated cytokines (such as interferon- γ and IL-4), but blocked by those that have encountered endotoxins (such as LPS) (20).

Taken together, these data support the ensuing idea that inflammatory demyelinating disorders, such as MS, can be viewed as the consequence of the *dysfunction of the endogenous stem cell compartment* rather than caused by an uncontrolled, and still undiscovered, pathogenic alien(s). This hypothesis may also accounts for heterogeneity of lesion development and composition as well as for the regional differences between lesions. Then, the concept that NPCs residing within the SVZ are "responsible of periventricular lesions" while multipotent

OPCs dispersed throughout the entire CNS “account for the lesions outside neurogenic areas”, might not sound that provocative.

NPC transplantation in MS: the *atypical ectopic niche*

As a consequence the derangement of brain germinal niches in MS, one possible approach to the treatment of MS may be to reconstitute the endogenous stem cell compartment by transplantation of functioning NPCs (Figure 2). However, reconstitution should take place in ectopic CNS areas owing to the fact that an *hostile inflamed microenvironment* is frequently found in major germinal niches from MS brains.

Some recent experiments have shown that in multifocal inflammatory CNS disorders (i.e., stroke, MS, brain tumors, spinal cord injury, epilepsy, brain trauma, amyotrophic lateral sclerosis etc.) therapeutic somatic stem cells [e.g. bone marrow stem cells (BMSC), umbilical cord blood stem cells (UCBSC), mesenchymal stem cells (MSC), NPC] - injected through the blood stream or into the cerebrospinal fluid circulation - can specifically reach inflamed CNS areas where they persist for months and promote recovery (21-25). The mechanism by which these cells, or at least those from neural origin, can specifically reach inflamed CNS areas has been recently elucidated in mice affected by chronic or relapsing-remitting EAE. In these mice, i.v.- and i.c.- injected NPCs specifically enter into inflamed areas of the CNS where they promote a marked reduction in demyelination, axonal loss and astrogliosis and - as a consequence - restore neurological functions (26-29). Specific homing is due to the fact that NPCs constitutively express high-affinity cell adhesion molecules (CAM) (such as CD44, α and β integrins) as well as functional chemokine receptors (such as CCR1, CCR2, CCR5, CXCR3 and CXCR4) (27).

These molecules render NPCs able to recapitulate certain functional pathways the immune cells use to invade the inflamed CNS. CAM-expressing NPCs are, in fact, capable of responding to local cytokine release (e.g. IL-6, IL-1 β , TNF α) in CNS areas of inflammation and, in turn, adhere spontaneously and migrate across to the inflamed endothelium. As a functional proof, *in vitro* pre-treatment of NPCs with neutralizing antibodies against α 4 integrin led to a reduction of around 50-60% in the number of injected NPCs accumulating within the brain and the spinal cord of EAE mice (27).

Once within inflamed CNS areas, systemically-injected NPCs accumulate (and persist) around the perivascular space where reactive astrocytes, inflamed endothelial cells and blood-borne infiltrating T cells co-reside. In these areas, named ‘*CNS atypical ectopic niches*’, a molecular cross talk - which can *bona fide* be postulated as the *functional* requisite for the therapeutic activity of transplanted NPCs - takes place between the different cells of the atypical niche. On one hand, the great majority of transplanted NPCs survive long term, while displaying undifferentiated features (e.g., round-shaped morphology and lack of major antigens of differentiation), owing to the focal release of stem cell regulators (e.g., BMPs, Noggin) by immune cells and reactive astrocytes. On the other

hand, NPCs promote neuroprotection by in situ releasing immunomodulatory molecules (e.g. antiinflammatory cytokines) and neurotrophic factors [e.g., nerve growth factor (NGF), fibroblast growth factor (FGF)-II, ciliary neurotrophic factor (CNTF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF)] (10, 27). Via the release/expression of immunomodulatory molecule (e.g. FasL, Apo3L, TRAIL) NPCs promote apoptosis of effector cells expressing death receptors (e.g. encephalitogenic Th1 cells). Via the release of neurotrophic growth factor (e.g., TGF β , FGF-II), NPCs also contribute to significant reduction of glial scarring (10, 26, 27). Last but not least, transplanted NPCs may also differentiate into myelin forming cells (26). As a net effect of these different mechanisms of neuroprotection, five-fold increase in demyelinating areas of the number of 'remyelinating' endogenous OPCs is obtained (26).

Conclusions

Recent results consistently challenge the sole and limited view that neural stem/precursor cells therapeutically work exclusively throughout cell replacement. NPC transplantation may also promote CNS repair via bystander mechanisms, mainly exerted by undifferentiated 'stem' cells releasing - at the site of tissue damage in response to environmental needs - a milieu of neuroprotective and immunomodulatory molecules. Thus, we can propose the concept of 'therapeutic plasticity', which can be viewed as the capacity of somatic stem cells to adapt their fate and function(s) to specific environmental needs occurring as a result of different pathological conditions. The challenging ability of transplanted NPCs to 'neuroprotect' the brain from several types of injuries using different and/or articulated bystander strategies is of pivotal importance for the future of stem cell based therapeutic approaches.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Italian Minister of Health, Italian Multiple Sclerosis Foundation (FISM) grant cod. 2004/R/15 to S.P., National Multiple Sclerosis Society (NMSS) grants cod. RG3591-A-1 and cod. TR 3762-A-1 to G.M.

References

1. Doetsch F. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci.* 2003; 6: 1127- 34.
2. Weiss S., Dunne C., Hewson J., Wohl C., Wheatley M., Peterson AC., et al. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci.* 1996; 16: 7599-609.
3. Doetsch F., Caille I., Lim DA., Garcia-Verdugo JM., Alvarez-Buylla A.. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 1999; 97: 703-16.
4. Laywell ED., Rakic P., Kukekov VG., Holland EC., Steindler DA.

- Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000 97: 13883-8.
5. Garcia AD., Doan NB., Imura T., Bush TG., Sofroniew MV. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci*. 2004; 7: 1233-41.
 6. Palmer TD., Willhoite AR., Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*. 2000; 425: 479-94.
 7. Seri B., Garcia-Verdugo JM., McEwen BS. Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*. 2001; 21: 7153-60.
 8. Mercier F., Kitasako JT., Hatton GI. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J Comp Neurol*. 2002; 451: 170-88.
 9. Martino G. How the brain repairs itself: new therapeutic strategies in inflammatory and degenerative CNS disorders. *Lancet Neurol*. 2004; 3: 372-8.
 10. Martino G., Pluchino S. The therapeutic potential of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7: 395-406.
 11. Patrikios P., Stadelmann C., Kutzelnigg A., Rauschka H., Schmidbauer M., Laursen H. et al. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain*. 2006; 129: 3165-72.
 12. Franklin RJ. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat Rev Neurosci*. 2002; 3: 705-14.
 13. Ming GL., Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 2005; 28: 223-50.
 14. Brundin L., Brismar H., Danilov AI., Olsson T., Johansson CB. Neural stem cells: a potential source for remyelination in neuroinflammatory disease. *Brain Pathol*. 2003; 13: 322-8.
 15. Picard-Riera N., Decker L., Delarasse C., Goude K., Nait-Oumesmar B., Liblau R. et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 13211-6.
 16. Menn B., Garcia-Verdugo JM., Yaschine C., Gonzalez-Perez O., Rowitch D., Alvarez-Buylla A. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci*. 2006; 26: 7907-18.
 17. Adams CW., Abdulla YH., Torres EM., Poston RN. Periventricular lesions in multiple sclerosis: their perivenous origin and relationship to granular ependymitis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1987; 13: 141-52.
 18. Lee MA., Smith S., Palace J., Narayanan S., Silver N., Minicucci L., et al. Spatial mapping of T2 and gadolinium-enhancing T1 lesion volumes in multiple sclerosis: evidence for distinct mechanisms of lesion genesis? *Brain*. 1999; 122: 1261-70.
 19. Monje ML., Toda H., Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*. 2003; 302: 1760-5.
 20. Butovsky O., Ziv Y., Schwartz A., Landa G., Talpalar AE., Pluchino S. et al. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogene-

- sis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci.* 2006; 31: 149-60.
21. Garbuzova-Davis S., Willing AE., Zigova T., Saporta S., Justen EB., Lane JC. et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. *J Hematother Stem Cell Res.* 2003; 12: 255-70.
 22. Chu K., Kim M., Park KI., Jeong SW., Park HK. Jung KH., et al. Human neural stem cells improve sensorimotor deficits in the adult rat brain with experimental focal ischemia. *Brain Res.* 2004; 1016: 145-53.
 23. Xiao J., Nan Z., Motooka Y., Low WC. Transplantation of a novel cell line population of umbilical cord blood stem cells ameliorates neurological deficits associated with ischemic brain injury. *Stem Cells Dev.* 2005; 14: 722-33.
 24. Liu H., Honmou O., Harada K. Nakamura K., Houkin K., Hamada H. et al. Neuroprotection by PIGF gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischaemia. *Brain.* 2006; 129: 2734-45.
 25. Ziv Y., Avidan H., Pluchino S., Martino G., Schwartz M. Synergy between immune cells and adult neural stem/progenitor cells promotes functional recovery from spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 13174-9.
 26. Pluchino S., Quattrini A., Brambilla E., Gritti A., Salani G., Dina G. et al. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature.* 2003; 422: 688-94.
 27. Pluchino S., Zanotti L., Rossi B. Brambilla E., Ottoboni L., Salani G. et al. Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. *Nature.* 2005; 436: 266-71.
 28. Einstein O., Karussis D., Grigoriadis N., Mizrachi-Kol R., Reinhartz E., Abramsky O. et al. Intraventricular transplantation of neural precursor cell spheres attenuates acute experimental allergic encephalomyelitis. *Mol Cell Neurosci.* 2003; 24: 1074-82.
 29. Ben-Hur T, Einstein O, Mizrachi-Kol R, Ben-Menachem O, Reinhartz E, Karussis D, et al. Transplanted multipotential neural precursor cells migrate into the inflamed white matter in response to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia.* 2003; 41: 73-80.

Impiego di cellule staminali nella terapia delle distrofie muscolari

Nereo Bresolin

Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università di Milano

Attualmente vi è grande interesse nei confronti delle cellule staminali e di una loro applicazione nel trattamento di patologie neurodegenerative (Galvin et al., 2006) e malattie neuromuscolari tra cui la distrofia muscolare di Duchenne (Cossu et al., 2000; Gussoni et al., 1999; Torrente et al., 2001). Purtroppo ci sono ancora alcuni problemi relativi all'utilizzo di cellule staminali adulte, primo fra tutti, il loro scarso numero, infatti si stima, ad esempio, che solo una tra 10000-15000 cellule nel midollo osseo sia una cellula staminale ematopoietica. Un'altra difficoltà è legata alla loro limitata capacità di proliferare e di differenziare in cellule muscolari. Certamente l'utilizzo di cellule staminali adulte, rispetto a quelle embrionali presenta dei rilevanti vantaggi: una più facile reperibilità, una maggior maneggevolezza, una minor problematicità di natura etica e legale e la possibilità di effettuare un trapianto autologo che permetterebbe di non immunosopprimere il ricevente, evitando tutte le complicazioni collegate a questo tipo di trattamento.

Recentemente è stato messo a punto un metodo per isolare da biopsie muscolari e da sangue periferico una popolazione di cellule staminali adulte con proprietà muscolari. Queste cellule esprimono in superficie l'antigene CD133, marker tipicamente espresso dalle cellule staminali ematopoietiche, e sono in grado di differenziare in muscolo (Gallacher et al., 2000; Yin et al., 1997). La valutazione delle potenzialità miogeniche di queste cellule è stata condotta sia con approcci sperimentali *in vitro* che *in vivo* utilizzando un modello murino di distrofia muscolare immunodepresso (topo *scid/mdx*). In tali esperimenti cellule circolanti CD133 + hanno dimostrato di poter esprimere marker miogenici precoci e di essere in grado di andare a localizzarsi sotto la lamina basale dei muscoli del topo ricevente, esprimendo markers caratteristici di cellule satelliti come M-caderina e Myf-5 (Torrente et al., 2004).

Inoltre è stato dimostrato che un'altra importante caratteristica biologica di queste cellule staminali muscolari è una notevole capacità migratoria attraverso i vasi dopo la loro iniezione nella circolazione arteriosa. Le cellule CD133 + infatti esprimono diverse molecole di adesione quali CD44, LFA-1, PSGL-1, α 4-inte-

grine, L-selectina e il recettore delle chemochine CCR7. Dopo esercizio muscolare nei topi distrofici si assiste ad un incremento dell'espressione di VCAM-1 nei vasi muscolari. VCAM-1 controllerebbe poi l'homing delle cellule CD133+, somministrate per via intra-arteriosa, nel muscolo distrofico (Gavina et al., 2006). L'ostacolo maggiore resta ancora la scarsità di cellule staminali che si riescono ad ottenere da tessuti adulti ed è per questo che gran parte del mondo scientifico sta lavorando per mettere a punto protocolli di crescita ed espansione in vitro, che consentirebbero di avere una più ampia disponibilità di cellule da poter trapiantare in maniera efficace. Ultimamente l'attenzione si sta concentrando su come indurre la proliferazione delle cellule staminali muscolari e su come combinare ciò con la terapia genica e cellulare per poter correggere il difetto genetico presente nelle cellule distrofiche. I soggetti affetti da distrofia muscolare di Duchenne, infatti, presentano mutazioni a livello del gene che codifica per la proteina distrofina, che è localizzato a livello del braccio lungo del cromosoma X (Xp21). Tale gene codifica per una proteina citoscheletrica, la distrofina, intermedia indispensabile per l'ancoraggio della fibra muscolare alla lamina basale che la circonda. Il malfunzionamento della distrofina si riflette sull'elasticità della fibra, portando alla sua degenerazione. Questa malattia è una patologia degenerativa che colpisce i muscoli e li rende progressivamente deboli fino a provocarne irreversibilmente la paralisi. La muscolatura scheletrica e cardiaca sono affette, fino ad arrivare alla dipendenza dalla sedia a rotelle intorno all'età di 10-11 anni, progressivo deficit respiratorio e morte prematura verso la seconda-terza decade di vita.

Il protocollo utilizzato per correggere il difetto genico consiste nel trattare queste cellule staminali selezionate con la metodica dell'*exon-skipping*, che permette la formazione di una isoforma della distrofina più corta della normale, ma altrettanto funzionante (Fabb et al., 2002; Goyenvallé et al., 2004). La maggior parte delle mutazioni alla base della DMD sono causate da delezioni che possono generare un codone di stop prematuro o una sequenza proteica non funzionale in termini di attacco ai complessi associati alla distrofina. Vi sono inoltre delezioni che tuttavia conservano il quadro di lettura originale portando alla produzione di una proteina di dimensioni ridotte ma funzionale e che caratterizza una forma di distrofia meno severa quale la Distrofia muscolare di Becker (BMD). L'approccio dell'*exon-skipping* è stato sviluppato per ricostituire un quadro di lettura corretto al momento della trascrizione del gene codificante per una proteina distrofina funzionale. In effetti, numerose delezioni, che possono concernere uno o più esoni, sono in grado di essere riportate ad un corretto quadro di lettura in seguito alla soppressione di uno o di diversi altri esoni della regione di interesse. La conoscenza della sequenza degli esoni del gene della distrofina permette di riconoscere facilmente gli esoni che sono nella corretta posizione rispetto a quelli mal posizionati. Ad esempio, la mutazione responsabile del fenotipo mdx nei topi, legata ad una sostituzione nucleotidica nell'esone 23 del gene della distrofina, causa la comparsa di un codone di stop prematuro in questo sito; lo *skipping* dell'esone 23 nei topi mdx permette di produrre una distrofina, certo ridotta, ma funzionale in ragione del corretto posizionamento degli esoni 22 e 24. Questi meccanismi di

skipping occasionalmente si presentano spontaneamente e sono responsabili della comparsa di fibre dette “revertant”, osservate mediante saggi di immunohistochemica su sezioni di muscoli mdx.

Bibliografia

1. Cossu, G., and Mavilio, F. Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: wishful thinking or therapeutic perspective? *J. Clin. Invest.* 2000; 105: 1669-1674.
2. Fabb SA., Wells DJ., Serpente P., Dickson G. Adeno-associated virus vector gene transfer and sarcolemmal expression of a 144 kDa micro-dystrophin efficiently restores the dystrophin-associated protein complex and inhibits myofibre degeneration in nude/mdx mice. *Hum. Mol. Genet* 2002; 11: 733-741.
3. Gallacher L. et al. Isolation and characterization of human CD34-Lin- and CD34+Lin-hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood.* 2000; 95: 2813-2820.
4. Galvin KA, and Jones DG. Adult human neural stem cells for autologous cell replacement therapies for neurodegenerative disorders. *NeuroRehabilitation.* 2006; 21: 255-265.
5. Gavina M., Belicchi M., Rossi B., Ottoboni L., Colombo F., Meregalli M., Battistelli M., Forzenigo L., Biondetti P., Pisati F., Parolini D., Farini A., Issekutz AC., Bresolin N., Rustichelli F., Constantin G., Torrente Y. VCAM-1 expression on dystrophic muscle vessels has a critical role in the recruitment of human blood-derived CD 133+ stem cells after intra-arterial transplantation. *Blood* 2006; 108: 2857-2866.
6. Goyenvallé A., Vulin A., Fougères F., Leturq F., Kaplan JC., Garcia L., Danos O. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 2004; 306: 1796-1799.
7. Gussoni, E. et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature.* 1999; 401: 300-304.
8. Torrente, Y. et al. Intraarterial injection of muscle-derived CD34+Sca-1+ stem cells restores dystrophin in mdx mice. *J. Cell Biol.* 2001; 152: 335-348.
9. Torrente Y., Belicchi M., Sampaolesi M., Pisati F., Meregalli M., D'Antona G., Tonlorenzi R., Porretti L., Gavina M., Mamchaoui K., Pellegrino MA., Furling D., Mouly V., Butler-Browne GS., Bottinelli R., Cossu G., Bresolin N. Human circulating AC 133 (+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 2004; 111:182-195.
10. Yin, AH. et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 1997; 90: 5002-5012.

Role of stem cell in diabetes therapy

Lorenzo Piemonti

Unità di Medicina Generale a indirizzo Diabetologico ed Endocrino-Metabolico,
Fondazione San Raffaele del Monte Tabor, Milano

Diabetes affects more than 200 million people worldwide, representing the third most common disease and fourth leading cause of death in North America. There are currently 30 000 new type 1 diabetics annually in North America. The incidence of type 2 diabetes in particular is increasing rapidly and accounts for the major impact of this disease. Diabetes (and mainly type 2) poses a colossal financial burden to our global society, comprising nine to 15% of healthcare expenses in developed countries. The mainstay treatment for type 1 diabetic patients is chronic insulin injection. While exogenous insulin therapy has dramatically reduced mortality from diabetes, patients often succumb to the long-term sequelae of diabetic angiopathy, either in the form of nephropathy, neuropathy or retinopathy. Maintaining rigorous glycaemic control with intensive insulin therapy has been shown to delay and sometimes prevent the progression of these complications (1), but patients are at risk of severe and sometimes fatal hypoglycaemic events (1). Although insulin pumps and implantable insulin-secreting devices are a promising approach to improved glucose homeostasis, the development of reliable and accurate glucose sensor technology has been a limiting factor. Replacement of pancreatic β -cells would represent an almost ideal treatment that could overcome this therapeutic dilemma. Transplantation of islets of Langerhans was shown to be successful in experienced centers but, due to shortage of organs and life long immunosuppression this therapy can be offered to a very limited number of patients only (2). Insulin secreting cells generated from stem cells could represent an attractive alternative(3).

Pancreatic islet transplantation

Between 1974 and 1999, over 450 cases of islet allotransplantation for the treatment of type 1 diabetes were reported to the Islet Transplant Registry, with less than 10% of patients achieving insulin independence for longer than 1 year; although 28% had sustained C-peptide secretion. The lack of clinical success was attributed to several factors, including inadequate islet transplant mass, ineffec-

tive prophylaxis against allograft rejection and autoimmune recurrence, and continued use of toxic, diabetogenic immunosuppressive agents such as cyclosporin and glucocorticoids. In consideration of these limitations, a new protocol was implemented in Edmonton, Canada in 1999 that radically changed the face of clinical islet transplantation. The initial series of seven type 1 diabetic patients all achieved and maintained insulin independence beyond 1 year, demonstrating for the first time that islet transplantation could be as effective at achieving insulin independence as whole pancreas transplantation (4). The success of the 'Edmonton Protocol' has been attributed to two key modifications from previous clinical trials. First, patients received an adequate number of high-grade islets prepared from an average of two donor organs. Second, more potent but less diabetogenic, steroid-free antirejection therapy was achieved using a novel combination of sirolimus, low-dose tacrolimus and an anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody (anti-IL-2R mAb). Since the release of the early Edmonton results, considerably more experience has been accrued both in Edmonton and at other centers worldwide. At the University of Alberta, a total of 66 patients have now received islet-alone transplants. Most patients continue to require two islet infusions in order to provide adequate engraft mass (approximately 12 000 IE/kg islet mass, based on the recipient body weight). Of patients undergoing completed islet transplants, 82% remain insulin free by the end of 1 year. There is some fall off in insulin independence, with 70% remaining insulin-free at 2 years and 50% free at 3 years post-transplant. Most patients that return to insulin continue to secrete endogenous insulin (and C-peptide) in sufficient amounts to continue to stabilize risk of hypoglycaemic reactions or of glycaemic liability, and 88% of patients continue to demonstrate islet function out to 5 years post-transplant. Islet transplantation has proven to be remarkably successful in stabilizing glucose control to a degree that is vastly superior to even intensive insulin therapy, and patients typically demonstrate normalization of HbA1C (5). An international multicentre trial of the Edmonton Protocol was recently completed by the Immune Tolerance Network in nine sites, and this study demonstrated that the original Edmonton findings could be replicated at times to a very high level of success, depending on the experience of the site (2). The trial teaches us several things. First, it is possible to conduct a large, multicenter, international trial in a young field in order to evaluate a complex and challenging means of technology. It is noteworthy that in order to recruit 36 patients, the investigators screened more than 2000 subjects for eligibility. Only 7% fulfilled the initial screening criteria, which included severe recurrent hypoglycemia, severe glycemic liability, progressive secondary complications, and the failure of conventional therapy. Second, many technical hurdles remain. Only 45% of islet isolations resulted in transplants, meaning that the majority of isolations were inadequate. Multiple islet infusions were also required: 31% of patients received a single infusion, 25% received two infusions, and 44% received three infusions, showing the difficulty of isolating and engrafting an adequate number of labile cells. Third, the clinical results were mixed. Of the 36 patients who entered the study, 44% attained the stringent primary end point of insulin independence, defined as a glycated hemo-

globin value of less than 6.5%, a glucose level after an overnight fast not exceeding 140 mg per deciliter (7.8 mmol per liter) more than three times per week, and a 2-hour postprandial glucose level not exceeding 180 mg per deciliter (10 mmol per liter) more than four times per week. A total of 28% of patients had partial graft function, defined by a C-peptide level of 0.3 ng per milliliter or more and the requirement of insulin or inadequate glycemic control. Another 28% had complete graft loss. Analyzed another way, 58% of the subjects reached insulin independence at some point during the trial, but 76% had become insulin-dependent again by 2 years after transplantation. The results can be seen according to the metaphor of the glass half full or half empty. The Edmonton protocol is clearly orders of magnitude better than previous attempts at islet transplantation. The study shows that institutions all over the world can successfully perform the protocol with at least short-term results that are promising. The problem remains that the medium- to long-term results are not durable, so much more work is needed. Fortunately, there is no lack of targets for focused and high-yield research, including increasing the donor supply, new techniques for the isolation of islets, an improved understanding of islet-cell proliferation, marked improvements in the understanding of immunology, the use of new immunosuppressive drugs, and the development of trophic factors for islets and their progenitors. From a policy standpoint, the question remains whether islet transplantation should remain primarily a research initiative available to a small number of highly selected patients or whether the technology should be more broadly disseminated. In this respect, islet transplantation should be compared with other treatments. Whole-organ pancreas transplantation is significantly better than islet transplantation, with a rate of 5-year graft survival in the range of 50 to 70%, far in excess of the 10% rate of survival of islet grafts. With regard to conventional therapies and the avoidance of diabetic complications, the Diabetes Control and Complications Trial clearly demonstrated that tight metabolic control in type 1 diabetes results in a significant reduction in the development and progression of retinopathy, microalbuminuria and macroalbuminuria, and neuropathy. The follow-up Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications study supported the idea that early intensive glycemic control has long-term benefits. The introduction of long-acting and rapid-acting insulin analogues, used in the basal-bolus paradigm, has markedly improved glycemic control. The use of such analogues, with continuous subcutaneous infusion pumps or as multiple daily injections, has had remarkable long-term results. Devices for monitoring blood glucose levels have become more advanced and are constantly being improved. Already in use are devices for continuous monitoring that read ambient blood glucose in real time, permitting immediate adjustment of the insulin dose. As new methods for noninvasive continuous monitoring advance, they will become the standard of care, assuming a reasonable cost. Another new development that may have an important effect on care is the closed-loop system, which combines continuous blood glucose monitoring, an algorithm for the conversion of glucose levels to insulin dose, and an insulin delivery device. The implications for glycemic control with the advent of these advanced techniques are that such therapy will be available to every patient,

not just a select few. The observation that patients with even a small amount of residual islet function, as evidenced by a persistent level of C peptide, have a marked decrease in episodes of diabetic hypoglycemia is provocative. Does such a low level of insulin prevent this complication? And, if so, why? Do the immunosuppressive medications have an effect on intermediary metabolism? Is there engraftment of stem cells? Has the immunosuppression allowed for regrowth of endogenous pancreatic stem cells and islets? These important questions - many of which are the subjects of ongoing investigations - deserve more scrutiny. Islet transplantation is at a crossroads. It is clear that poor long-term results, high costs, and the relatively high incidence of major and minor serious adverse events make it difficult to argue for expansion of islet transplantation to the general population. Nonetheless, the dramatic discoveries and successful dissemination of information in a relatively short period encourage us to believe these advances will continue apace. Additional research investments are likely to be high yield and to have a positive effect on many patients in the not-too-distant future. Worldwide, there have now been over 350 patients treated since 1999, and increasing momentum and focus on the remaining challenges of islet isolation, alternative insulin-secreting regulated sources and better immunosuppression with less side-effects, and the possibility of immunological tolerance continue to drive the field forward.

Embryonic stem cells (ESC)

Embryonic stem cells (ESC) have the potential for almost unlimited supply of b-cells (6-8) but there are considerable ethical concerns regarding the use of human ESC (9-16). The generation of individual, patient specific stem cell-derived b-cells for transplantation purposes requires therapeutic cloning of human ESC. Cloning of embryonic stem cells is already accomplished in mice and other mammals (9-16). The only paper so far that claimed to have cloned human ESC reported fabricated data (17). Another problem with ESC is related to their enormous proliferative capacity and the risk for development of teratocarcinoma. Therefore, many scientists continue to evaluate the not yet exhausted potential of adult stem/progenitor cells. Nevertheless, research with human ESC may help to decipher some crucial steps in development of pancreatic endocrine cells in vitro, since almost all data available on pancreas development were obtained from animal models. Recently, one important step towards differentiation and isolation of endodermal cells, the presumed precursors for pancreatic cells, was achieved in mouse and human ESC (18, 19).

Potential sources for adult stem cells within the pancreas

Stem/progenitor cells with the potential to differentiate into insulin-producing cells in vitro and/or in vivo were described in pancreatic islets (20-22), pancreatic ducts (3), among the population of pancreatic acinar cells (23-25) and within adult or foetal pancreas without further specification (26-28). In some instances progenitor cells were postulated in pancreatic ducts that would expand and dif-

ferentiate into insulin-producing cells in response to specific stimuli³. Whereas in the case of acinar cells a de-differentiation appears to be the first step followed by re-differentiation into b-cells. The origin of the bona fide stem cell however, remains somewhat elusive and a recent report questioned the entire concept of b-cell stem/progenitor cells with studies using genetic lineage tracing experiments (29). With this approach it has been shown that pre-existing b-cells rather than adult stem/progenitor cells retained a proliferative capacity and may thus represent the major source of new b-cells in adult life, at least in mice (29). In this study the authors almost excluded the possibility of stem or progenitor cells to play a role in b-cell replacement in adult life. This extreme position however may not be justified by the data, given the fact that the study was not designed to identify precursor cells per se but rather to provide evidence for or against their participation in b-cell regeneration. And, this study is in conflict with numerous recent *in vivo* and *in vitro* studies suggesting the existence of pancreatic stem/precursor cells. Today, it is not evident which of the concepts will pass the test of time.

Nestin-expressing mesenchymal stem cells from human islets of Langerhans

The development of normal pancreas is the result of close interaction between mesenchymal and epithelial cells that form the initial buds. Signals from mesenchymal cells direct pancreatic development towards endocrine or exocrine fate (30) for review). Mesenchymal cells of the developing pancreas express the transcriptional factor islet 1 (Isl-1) (31) that is also expressed in pancreatic epithelial cells, as well as nestin, a neural stem cell marker (32). Nestin-positive cells have been also described in human and rat islets of Langerhans including the hypothesis that these cells may represent a stem cell population (21). It has been shown that cultured nestin-expressing cells from adult human islets can be differentiated into insulin expressing cells (21, 22), and nestin-positive cells isolated from human foetal pancreas can be expanded and differentiated into insulin-expressing islet-like clusters that reversed hyperglycaemia in diabetic mice (27). A recent study described clonal multipotential precursors from adult mouse pancreas that were able to generate neural and pancreatic lineages (28). The respective precursor cells were generated initially from both nestin+ and nestin- cells, but all of them expressed nestin during the expansion period indicating that nestin may be a marker of proliferating stem cells. Nestin is believed to play an important role in the selective, unequal partitioning of cytoplasmic components during the division of stem cells so as to maintain one daughter cell as a stem cell and the other daughter cell as a “differentiated” cell. Others described that nestin-expressing cells in the pancreas may be part of vascular endothelial cells or pancreatic stellate cells (33). In addition, studies including cell lineage analyses indicate that during development nestin-expressing cells may give rise to exocrine pancreatic cells (34, 35) but not endocrine lineages (34, 37). A very recent report however, described expression of exocrine as well as endocrine markers in nestinpositive

cells isolated from the developing pancreas of nestin/EGFP transgenic mice (38). Thus, the developmental potential of nestin-positive cells may also include endocrine cells. Even though it has been shown that nestin-expressing cells are part of mesenchymal cells of the developing pancreas (39) their fate or function in postnatal life are unknown. Stem cells with a mesenchymal phenotype have been recently shown to develop in human islet cultures *in vitro* by de-differentiation of epithelial b cells induced by powerful growth factors like epidermal growth factor (EGF) or fibroblast growth factor (FGF) (40)⁴. This phenomenon is named epithelial to mesenchymal transition (EMT) (40). The islet derived mesenchymal cells express nestin and vimentin and were able to re-differentiate into insulin-producing cells given the appropriate stimuli⁴⁰. In our current research project we isolated and nestin-positive cells from cultured human islets. Interestingly, these cells were also positive for Isl-1 that is known for its critical role in the development of pancreatic endocrine cells. In addition, the isolated nestin- and Isl-1-positive cells displayed a mesenchymal phenotype as mirrored by their ability to differentiate into adipocytic and osteocytic phenotypes given the appropriate stimuli. These cells were negative for insulin and the insulin promoter factor 1 (Ipf-1). Upon differentiation with serum free medium supplemented with a cocktail of differentiation stimulating factors they could be induced to form islet-like cluster and to express several pancreatic developmental genes, as recently reported (41). Although these results are encouraging and indicate that such cells may have the potential to become functioning b-cells the actual differentiation efficacy is limited and the cells are not yet able to secrete insulin in response to glucose. There is however evidence that cultured nestin-positive cells from human islets are multipotent as they can adopt a hepatic phenotype *in vivo*. Interestingly, human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) were also recently described to differentiate into a hepatic phenotype *in vivo* without evidence for cell fusion. These data suggest that cells with a mesenchymal phenotype may share properties of hepatic precursor/stem cells.

Stem cells outside the pancreas as potential source for b-cell replacement

Stem cells with the potential to differentiate into insulin-producing cells have been also described in the liver (42, 43), the central nervous system (44), the spleen (45) and bone marrow (46, 47). Some of the *in vivo* reports however are controversial and were not confirmed by others (50-53). Another hypothesis generated by recent data suggests that at least *in vivo* bone marrow-derived cells could play a supportive role in pancreas regeneration rather than participate in the differentiation of endocrine cells themselves (51). Such developmental potential of bone marrow-derived MSC however was described *in vitro*. MSC from mouse and rat bone marrow were shown to harbour the potential to differentiate into insulin-secreting cells *in vitro* and to reverse hyperglycaemia in an animal model of diabetes (47, 49). Recently human bone marrow-derived MSC were described to express at low level the islet transcription factor Nkx-6.1 and to differentiate into insulin-expressing cells upon adenoviral transduction with vectors encoding

the transcription factors *Ipf-1*, *Hlx-9* or *Foxa-2* (54). The mechanisms underlying this apparent developmental plasticity of MSC are unknown. Interestingly, MSC were also shown to bear the potential to adopt a neural phenotype *in vitro* and *in vivo* in rodents and humans suggesting a neuro-endocrine developmental capacity of these cells. Expanding MSC express several stem cell marker-like stem cell factors (SCF) and *Thy-1* but also *nestin*. Neural precursor cells express besides *nestin* the side population stem cell marker *ABCG2*. *ABCG2* expression was described in *nestin*-positive islet-derived precursor cells. *Nestin* and possibly *ABCG2* expression could therefore represent a possible link between MSC and their ability to differentiate into neuroendocrine cells. In addition to bone marrow derived MSC another cell type of haematopoietic origin was recently discovered as potential source for pluripotent stem cells. Human peripheral blood monocyte-derived subset of proliferating cells appear to have the potential to differentiate *in vitro* in different cell lineages including neural, hepatic (55) and pancreatic phenotype with induction of insulin production (56). There is an increasing body of evidence suggesting that adult stem cells may indeed be converted into insulin-producing cells although the efficacy needs substantial improvements and the mechanisms responsible for this phenomenon are poorly understood.

Potential and limitations of adult mesenchymal stem cells

It has been shown that human bone marrow-derived MSC can be differentiated into hepatocytes *in vivo* without evidence for cell fusion if xenografted directly into the rat liver. This demonstrates an unexpected developmental potential of these cells. Liver and pancreas are believed to origin from similar endodermal precursors during development. Pancreatic stem/precursor cells can give rise to hepatocyte and vice versa. It is therefore tempting to speculate that human tissue- as well as bone marrow-derived MSC harbour the potential to adopt a pancreatic endocrine phenotype and give rise to functioning insulin-secreting cells. It has shown that human MSC from pancreatic islets as well as tissue can be induced to activate pancreatic developmental genes including *Isl-1*, *Ipf-1*, *Ngn-3*, *Pax-4*, *Pax-6*, *Nkx-2.2*, *Nkx-6.1*, as well as the islet genes *insulin*, *glucagon* and *somatostatin*. This differentiation was achieved without genetic modifications of the cells. However, we are still far away from production of clinically meaningful amounts of insulin. Although, impressive knowledge accumulated in recent years regarding pancreas development and especially the role of crucial transcription factors required for proper differentiation of pancreatic b-cells, there is considerable lack of information on factors needed for *in vitro* differentiation of stem cells; ESC and adult stem cells alike.

There is no unequivocally accepted protocol for differentiation of stem cells into insulin-producing cells and there is little general agreement on the cell type that should be studied. The overall potential of adult cells to change their fate *in vitro* and differentiate into almost every tissue was again demonstrated recently, using adult fibroblasts that were converted into cells with ESC-like phenotype by

manipulating just 4 important factors⁵⁷. There is substantial circumstantial evidence suggesting that MSC may have the potential to differentiate into various tissues including insulin-producing cells in vitro. But, the candidate cells among the MSC that harbour this potential need to be identified together with a considerable improvement of current differentiation protocols in order to achieve significant advancements in the search for stem cell-based therapies for diabetes mellitus type 1.

Bibliografia

1. Hypoglycemia in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Diabetes* 46, 271-86 (1997).
2. Shapiro AM. et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 355, 1318-30, 2006..
3. Bonner-Weir, S. & Sharma, A. Pancreatic stem cells. *J Pathol* 197, 519-26, 2002.
4. Shapiro AM. et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343, 230-8, (2000).
5. Ryan EA. et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 54, 2060-9, 2005.
6. Roche E. et al. Therapeutic potential of stem cells in diabetes. *Handb Exp Pharmacol*, 147-67, 2006.
7. Vaca P. et al. Induction of differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells by fetal soluble factors. *Stem Cells* 24, 258-65, 2006.
8. Soria B., Roche E., Reig JA. & Martin F. Generation of insulin-producing cells from stem cells. *Novartis Found Symp* 265, 158-67; discussion 167-73, 204-11, 2005.
9. Hall VJ., Stojkovic P. & Stojkovic M. Using therapeutic cloning to fight human disease: a conundrum or reality? *Stem Cells* 24, 1628-37, 2006.
10. Evans M. Ethical sourcing of human embryonic stem cells—rational solutions? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 663-7, 2005.
11. Murray TH. Ethical (and political) issues in research with human stem cells. *Novartis Found Symp* 265, 188-96; discussion 196-211, 2005.
12. Daar AS., Bhatt A., Court E. & Singer PA. Stem cell research and transplantation: science leading ethics. *Transplant Proc* 36, 2504-6, 2004.
13. McLean, M. R. What's in a name? "Nuclear transplantation" and the ethics of stem cell research. *Hastings Law J* 53, 1017-34, 2002.
14. Curtis MG. Cloning and stem cells: processes, politics, and policy. *Curr Womens Health Rep* 3, 492-500, 2003.
15. Bowring F. Therapeutic and reproductive cloning: a critique. *Soc Sci Med* 58, 401-9, 2004.
16. FitzGerald K. Cloning: can it be good for us? An overview of cloning technology and its moral implications. *Univ Toledo Law Rev* 32, 327-36, 2001.

17. Chong S. & Normile D. Stem cells. How young Korean researchers helped unearth a scandal. *Science* 311, 22-5, 2006.
18. D'Amour KA. et al. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 23, 1534-41, 2005.
19. Yasunaga M. et al. Induction and monitoring of definitive and visceral endoderm differentiation of mouse ES cells. *Nat Biotechnol* 23, 1542-50, 2005.
20. Guz Y., Nasir I. & Teitelman G. Regeneration of pancreatic beta cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes. *Endocrinology* 142, 4956-68, 2001.
21. Zulewski H. et al. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 50, 521-33, 2001.
22. Abraham EJ., Leech CA., Lin JC., Zulewski H. & Habener JF. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology* 143, 3152-61, 2002.
23. Baeyens, L. et al. In vitro generation of insulin-producing beta cells from adult exocrine pancreatic cells. *Diabetologia* 48, 49-57, 2005.
24. Lardon J., Huyens N., Rooman I. & Bouwens, L. Exocrine cell transdifferentiation in dexamethasone-treated rat pancreas. *Virchows Arch* 444, 61-5, 2004.
25. Minami K. et al. Lineage tracing and characterization of insulin-secreting cells generated from adult pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 15116-21, 2005.
26. Ramiya VK. et al. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* 6, 278-82, 2000.
27. Huang H. & Tang X. Phenotypic determination and characterization of nestin-positive precursors derived from human fetal pancreas. *Lab Invest* 83, 539-47, 2003.
28. Seaberg RM. et al. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol* 22, 1115-24, 2004.
29. Dor Y., Brown J., Martinez OI. & Melton DA. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429, 41-6, 2004.
30. Scharfmann R. Control of early development of the pancreas in rodents and humans: implications of signals from the mesenchyme. *Diabetologia* 43, 1083-92, 2000.
31. Ahlgren U., Pfaff SL., Jessell TM., Edlund T. & Edlund H. Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* 385, 257-60, 1997.
32. Lendahl U., Zimmerman LB. & McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585-95, 1990.
33. Lardon J., Rooman I. & Bouwens L. Nestin expression in pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells. *Histochem Cell Biol* 117, 535-40, 2002.

34. Esni F., Stoffers DA., Takeuchi T. & Leach SD. Origin of exocrine pancreatic cells from nestin-positive precursors in developing mouse pancreas. *Mech Dev* 121, 15-25, 2004.
35. Delacour A., Nepote V., Trumpp A. & Herrera PL. Nestin expression in pancreatic exocrine cell lineages. *Mech Dev* 121, 3-14, 2004.
36. Treutelaar MK. et al. Nestin-lineage cells contribute to the microvasculature but not endocrine cells of the islet. *Diabetes* 52, 2503-12, 2003.
37. Humphrey RK. et al. Characterization and isolation of promoter-defined nestin-positive cells from the human fetal pancreas. *Diabetes* 52, 2519-25 2003.
38. Bernardo AS. et al. Presence of endocrine and exocrine markers in EGFP-positive cells from the developing pancreas of a nestin/EGFP mouse. *Mol Cell Endocrinol* 253, 14-21, 2006.
39. Edlund H. Pancreatic organogenesis-developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet* 3, 524-32, 2002.
40. Gershengorn MC. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells. *Science* 306, 2261-4, 2004.
41. Eberhardt M. et al. Multipotential nestin and Isl-1 positive mesenchymal stem cells isolated from human pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 1167-76, 2006.
42. Zalzman M., Anker-Kitai L. & Efrat S. Differentiation of human liver-derived, insulin-producing cells toward the beta-cell phenotype. *Diabetes* 54, 2568-75, 2005.
43. Sapor, T. et al. Cell-replacement therapy for diabetes: Generating functional insulin-producing tissue from adult human liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7964-9, 2005.
44. Hori Y., Gu X., Xie X. & Kim SK. Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells. *PLoS Med* 2, e103, 2005.
45. Kodama S., Kuhlreiber W., Fujimura S., Dale EA. & Faustman DL. Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. *Science* 302, 1223-7, 2003.
46. Ianus A., Holz GG., Theise ND. & Hussain MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 111, 843-50, 2003.
47. Tang DQ. et al. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes* 53, 1721-32, 2004.
48. D'Ippolito G. et al. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 117, 2971-81, 2004.
49. Oh SH. et al. Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab Invest* 84, 607-17, 2004.
50. Lechner, A. et al. No evidence for significant transdifferentiation of bone marrow into pancreatic beta-cells in vivo. *Diabetes* 53, 616-23, 2004.

51. Hess D. et al. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* 21, 763-70, 2003.
52. Nishio, J. et al. Islet recovery and reversal of murine type 1 diabetes in the absence of any infused spleen cell contribution. *Science* 311, 1775-8, 2006.
53. Chong AS. et al. Reversal of diabetes in non-obese diabetic mice without spleen cell-derived beta cell regeneration. *Science* 311, 1774-5, 2006.
54. Moriscot C. et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro. *Stem Cells* 23, 594-603, 2005.
55. Zhao Y., Glesne D. & Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2426-31, 2003.
56. Ruhnke M. et al. Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology* 128, 1774-86, 2005.
57. Takahashi K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-76, 2006.

Cellule staminali e riparazione renale

Marina Morigi

Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Bergamo

Capacità rigenerativa delle cellule staminali del midollo osseo

Negli ultimi anni diversi studi hanno documentato che cellule staminali derivate dal midollo osseo, cellule ematopoietiche e cellule mesenchimali, hanno una notevole plasticità in quanto possono differenziare in linee cellulari diverse dal loro tessuto d'origine come epatociti, cellule muscolari cardiache, cellule endoteliali e pancreatiche (1-4). Queste cellule staminali sono anche in grado di contribuire al ricambio e alla rigenerazione di alcuni tipi cellulari nel rene dando origine a cellule mesangiali, podociti e cellule endoteliali (5-11). In topi femmine irradiate e trapiantate con midollo osseo di topi maschi, si è osservato che le cellule del midollo migravano nel rene e partecipavano al normale ricambio dell'epitelio tubulare, come dimostra la co-localizzazione del cromosoma Y con un marcatore delle cellule tubulari epiteliali (sito di legame per la lectina *Lens culinaris*) in più dell'8% dei tubuli (10). Un altro studio conferma la presenza di cellule tubulari renali derivate dal midollo osseo in topi con lesioni tubulari acute indotte da trattamento con acido folico (12). Le cellule staminali del midollo osseo si localizzavano in prossimità dell'area danneggiata generando cellule tubulari e cellule mesangiali e stimolavano la proliferazione delle cellule tubulari residenti (12, 13). Non solo nel modello sperimentale, ma anche in pazienti maschi affetti da necrosi tubulare acuta, in seguito a trapianto di rene da donatore femmina, è stata documentata la presenza di cellule derivate dal midollo osseo nell'1% dei tubuli (11). Queste cellule, positive per il cromosoma Y, esprimevano anche la citocheratina, tipicamente espressa da cellule epiteliali ed erano negative per il CD45 marcatore di cellule ematopoietiche, supportando così l'ipotesi che cellule di origine extra-renale, forse cellule mesenchimali, potessero partecipare alla rigenerazione del tessuto renale danneggiato (11).

Cellule staminali mesenchimali partecipano alla rigenerazione del tessuto renale

Attenzione particolare è stata dedicata alle cellule staminali mesenchimali (MSC) come fonte cellulare per la terapia rigenerativa. Tali cellule nel midollo osseo rap-

presentano i progenitori degli osteociti, condrociti, adipociti e supportano l'ematopoiesi (14, 15). Studi sia *in vitro* che *in vivo* hanno evidenziato la capacità delle MSC di differenziare in tessuti diversi da quello di origine e di generare cardiomiociti (16), cellule neuro-ectodermiche (17) e cellule epatiche (18). In un organismo adulto, le MSC oltre che nel midollo osseo sono state identificate anche in altri organi come il cervello, la milza, il fegato, il rene, i polmoni, i muscoli, il timo e il pancreas (19). Cellule staminali mesenchimali marcate *in vitro* con una proteina fluorescente (green fluorescent protein) e iniettate in topi (20) e in babbuini irradiati (21), si distribuivano in diversi organi non-ematopoietici incluso il rene, fegato, polmone, timo e pelle. All'interno di questi tessuti esse proliferavano, partecipando così al ricambio cellulare fisiologico (21).

Che le MSC possano dare origine a tessuto renale durante lo sviluppo embrionale del rene è stato dimostrato in un recente lavoro (22), dove MSC umane sono state impiantate in un sito nefrogenico di un embrione di ratto (al giorno 11). All'analisi istologica si è osservato che le MSC si riprogrammavano per dare origine a cellule morfologicamente identiche a quelle renali come cellule epiteliali glomerulari e tubulari. Le MSC contribuivano così a formare un 'neo-rene' in cui i nefroni erano parzialmente, e in alcuni casi quasi completamente, generati dalle cellule umane. Inoltre, le MSC umane iniettate in topi con la malattia di Fabry - incapaci di sintetizzare l'enzima α -galactosidase (α -gal) coinvolto nel catabolismo dei lipidi - formavano nefroni che esprimevano quantità significative di α -gal rispetto a topi Fabry non trattati (22). Questo approccio potrebbe avere importanti implicazioni per la produzione di specifiche cellule o tessuti da MSC autologhe in cui è stata corretta l'anomalia genetica.

Ruolo funzionale delle cellule staminali mesenchimali nell'insufficienza renale acuta

Il nostro gruppo ha recentemente documentato che una popolazione cellulare di MSC isolata dal midollo osseo di topi maschi e iniettata in topi femmina con insufficienza renale acuta indotta da cisplatino, era in grado di ripristinare la funzionalità renale e la struttura renale tubulare (23). Cellule positive per il cromosoma Y, individuate all'interno dell'epitelio tubulare, mostravano anche positività per la lectina *Lens culinaris*, indicando così che le MSC raggiungevano i tubuli danneggiati e differenziavano in cellule epiteliali tubulari (23). Inoltre, le MSC acceleravano significativamente la proliferazione delle cellule epiteliali tubulari prossimali, positive al marcatore nucleare Ki-67, in risposta ad un danno da cisplatino (23). L'effetto protettivo delle MSC è stato descritto anche in un modello murino di insufficienza renale acuta indotta da glicerolo (24). Questi risultati provano l'efficacia delle MSC nel riparo del danno renale acuto, anche se i meccanismi alla base di questo effetto protettivo non sono ancora del tutto chiari. Una possibilità è che la protezione a livello dell'epitelio tubulare renale sia dovuta alla capacità delle MSC di raggiungere il rene danneggiato e integrarsi/differenziarsi all'interno dei tubuli (schema). D'altra parte l'effetto benefico delle MSC, potrebbe essere dovuto alla loro abilità di produrre alti livel-

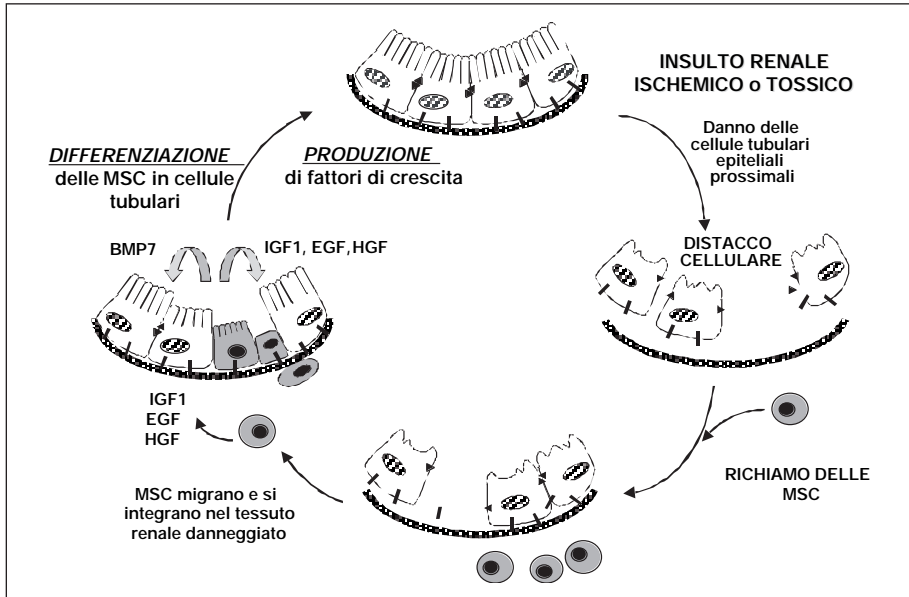


Fig. 1 - Schema sui possibili meccanismi di rigenerazione renale in seguito ad un danno ischemico o tossico.

li di citochine ad attività anti-infiammatoria, fattori di crescita e fattori angiogenici (25, 26). (schema). L'ipotesi che il rilascio locale di tali fattori da parte delle cellule staminali giochi un ruolo importante nel riparo del tessuto renale, è stato recentemente supportata da dati ottenuti in un modello di ischemia/riperfusione nel ratto (27). L'iniezione di MSC in ratti con insufficienza renale acuta portava ad un miglioramento della funzionalità renale, aumentando la proliferazione cellulare e diminuendo l'apoptosi a livello dei tubuli prossimali renali. Nel tessuto renale, però, sono state trovate poche cellule staminali, essenzialmente nei capillari peritubulari, escludendo così la possibilità che queste cellule potessero esercitare un effetto benefico attraverso la loro differenziazione in cellule tubulari epiteliali. Questo lavoro conclude che il contributo delle MSC alla rigenerazione tubulare passi attraverso un meccanismo paracrino che coinvolge la produzione da parte delle MSC di fattori di crescita (HGF, VEGF e IGF-1) e di fattori anti-infiammatori e protettivi quali IL-10, FGF e Bcl-2 (27). La capacità delle MSC di dare origine alle cellule tubulari renali è stata fortemente discussa anche nel recente lavoro di Duffield (28). Si è osservato che le MSC erano in grado di ridurre il danno tubulare e di proteggere la funzione renale in topi ischemici, ma non di differenziare in cellule renali (28).

Infine, un altro possibile fenomeno che spiegherebbe gli effetti delle MSC è la fusione cellulare tra le cellule staminali e cellule renali. Sebbene non sia stata molto studiata, i pochi dati a disposizione suggeriscono che la fusione rimane un evento molto raro nel rene (12).

Concludendo, le cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo, in

virtù del loro tropismo per il rene e del potenziale rigenerativo, possono rappresentare una valida alternativa per una futura applicazione terapeutica in pazienti con insufficienza renale acuta. Bisogna però considerare che tale malattia si sviluppa in breve tempo, e quindi l'utilizzo di MSC autologhe, isolate cioè dallo stesso paziente, non è così attuabile poiché occorrono molti giorni per isolarle ed espanderle in vitro. Sembra più fattibile l'uso di cellule staminali allogeniche, preventivamente isolate da donatori, fatte crescere in vitro e poi congelate. Quanto al problema immunologico, l'uso di MSC allogeniche potrebbe essere possibile in quanto tali cellule hanno proprietà immunomodulatorie, sono in grado cioè di inibire e regolare l'attività dei linfociti T (29). Inoltre le MSC umane non esprimono gli antigeni di istocompatibilità di classe II (30), molecole co-stimolatorie come B7-1 e -2, CD40 e CD40L, e non attivano le cellule T alloreattive (25, 31). Questa loro peculiarità le rende molto interessanti nell'ottica di possibili terapie cellulari senza l'uso combinato di farmaci immunosoppressori.

Bibliografia

1. Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Med* 2000; 6: 1229-34.
2. Ianus A., Holz GG., Theise ND., Hussain MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003; 111: 843-50.
3. Reyes M., Dudek A., Jahagirdar B., Koodie L., Marker PH., Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002; 109:337-46.
4. Herzog EL., Chai L., Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102: 3483-93.
5. Poulosom R., Alison MR., Cook T. et al. Bone marrow stem cells contribute to healing of the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14 Suppl 1: S48-54.
6. Ito T., Suzuki A., Imai E., Okabe M., Hori M. Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2625-35.
7. Imasawa T., Utsunomiya Y., Kawamura T. et al. The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1401-9.
8. Uchimura H., Marumo T., Takase O., et al. Intrarenal injection of bone marrow-derived angiogenic cells reduces endothelial injury and mesangial cell activation in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 997-1004.
9. Li B., Morioka T., Uchiyama M., Oite T. Bone marrow cell infusion ameliorates progressive glomerulosclerosis in an experimental rat model. *Kidney Int* 2006; 69: 323-30.
10. Poulosom R., Forbes SJ., Hodivala-Dilke K., et al. Bone marrow contributes

- to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol* 2001; 195: 229-35.
11. Gupta S., Verfaillie C., Chmielewski D., Kim Y., Rosenberg ME. A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure. *Kidney Int* 2002; 62: 1285-90.
 12. Fang TC., Alison MR., Cook HT., Jeffery R., Wright NA., Poulosom R. Proliferation of bone marrow-derived cells contributes to regeneration after folic acid-induced acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1723-32.
 13. Szczypka MS. Westover AJ., Clouthier SG., Ferrara JL., Humes HD. Rare incorporation of bone marrow-derived cells into kidney after folic acid-induced injury. *Stem Cells* 2005; 23:44-54.
 14. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19: 180-92.
 15. Pereira RF., Halford KW., O'Hara MD. et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4857-61.
 16. Toma C., Pittenger MF., Cahill KS., Byrne BJ. Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105: 93-8.
 17. Kopen GC., Prockop DJ., Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10711-6.
 18. Schwartz RE., Reyes M., Koodie L., et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-302.
 19. da Silva Meirelles L., Chagastelles PC., Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006; 119: 2204-13.
 20. Anjos-Afonso F., Siapati EK., Bonnet D. In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *J Cell Sci* 2004; 117: 5655-64.
 21. Devine SM., Cobbs C., Jennings M., Bartholomew A., Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 2003; 101: 2999-3001.
 22. Yokoo T., Ohashi T., Shen JS., et al. Human mesenchymal stem cells in rodent whole-embryo culture are reprogrammed to contribute to kidney tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3296-300.
 23. Morigi M., Imberti B., Zoja C., et al. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1794-804.
 24. Herrera MB., Bussolati B., Bruno S., Fonsato V., Romanazzi GM., Camussi G. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med* 2004; 14: 1035-41.

25. Majumdar MK., Thiede MA., Haynesworth SE., Bruder SP., Gerson SL.. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res* 2000; 9: 841-8.
26. Matsumoto K. Nakamura T. Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Int* 2001; 59: 2023-38.
27. Togel F., Hu Z., Weiss K., Isaac J., Lange C., Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; In press.
28. Duffield JS., Park KM.Hsiao LL., et al. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest* 2005; 115: 1743-55.
29. Aggarwal S., Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105: 1815-22.
30. Le Blanc K., Tammik C., Rosendahl K., Zetterberg E., Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003; 31: 890-6.
31. Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838-43.

**CELLULE STAMINALI
NEOPLASTICHE**

Identificazione delle cellule staminali leucemiche/tumorali: necessità diagnostica per terapie innovative

Carlo Bernasconi

Già Professore Ordinario di Ematologia, Università di Pavia.

Consulente ematologo e coordinatore della ricerca sulle cellule staminali, IRCCS Fondazione “Salvatore Maugeri”, Pavia

Un problema oggi di fondamentale importanza nella ricerca oncologica è quello di identificare e isolare le cellule capaci di iniziare e sostenere la crescita del tumore, cioè le cellule staminali tumorali (Dick, 2003; Al-Hajj e Clarke, 2004). Infatti, i tumori sia dei tessuti ematopoietici che di organi solidi (come ad esempio i tumori del sistema nervoso centrale e il carcinoma della mammella) contengono una popolazione eterogenea di cellule maligne, che differiscono marcatamente per la loro capacità di proliferare e di automantenersi. Sono soltanto le cellule maligne con caratteristiche di staminalità (cioè con capacità di automantenimento) quelle che sostengono la continua crescita tumorale, e che sono responsabili delle metastatizzazioni e delle ricadute; le altre cellule più mature, che costituiscono la gran parte della massa tumorale, dopo alcune divisioni cellulari sono destinate a compiere il loro ciclo vitale, a esaurirsi e scomparire.

I concetti sulle cellule staminali dei tumori solidi sono in gran parte derivati dalle acquisizioni raccolte con gli studi condotti sulle cellule staminali leucemiche (Wang e Dick, 2005). Al riguardo è da sottolineare che, anche se l'idea dell'esistenza di cellule staminali leucemiche/tumorali non sia proprio nuova, essa non è stata seriamente considerata ed esaminata sino a quando non è stato possibile studiare i vari passaggi della moltiplicazione/differenziazione delle cellule staminali normali, e non è stato possibile isolare le popolazioni di cellule staminali/progenitrici tumorali per sottoporle a test sia di staminalità che di malignità.

I più recenti studi condotti sul raffronto fra meccanismi di crescita delle cellule staminali normali e corrispondenti cellule staminali neoplastiche hanno dimostrato che i percorsi che regolano l'autorinnovamento e la differenziazione delle cellule normali sono deregolati nelle cellule tumorali, portando ad una continua ed anarchica espansione neoplastica (Al-Hajj e Clarke, 2004). Lo scopo principale delle indagini oggi condotte in questo settore della ricerca è quello di chiarire le alterazioni genetiche e molecolari che portano a questa deregolazione, e

che quindi sono responsabili dell'insorgenza del tumore. Ne consegue che i farmaci che avranno come bersaglio tali alterazioni potranno migliorare la terapia del tumore, e nei casi più favorevoli consentirne l'eradicazione.

In conclusione, è importante avere precise conoscenze sulla biologia delle cellule staminali/progenitrici normali e tumorali, per determinare quali proprietà sono mutate nelle cellule maligne e poter individuare i bersagli di terapie innovative. Premessa a questi studi sono l'isolamento e l'identificazione delle cellule staminali tumorali; in tali cellule si potranno poi studiare i meccanismi genetici e molecolari che ne determinano la malignità, e valutare le possibili modalità per contrastarne l'intervento. Solo l'eradicazione del compartimento delle cellule staminali di un tumore può consentire di ottenerne una duratura remissione, e possibilmente anche la guarigione (Al-Hajj et al., 2004; Jordan, 2005; Jordan et al., 2006).

Biologia e definizione delle cellule staminali tumorali

Cellule staminali esistono in molti (forse in tutti) tessuti/organi somatici, e sono essenziali per la loro fisiologia. Le popolazioni delle cellule che derivano dalle cellule staminali sono organizzate in modo gerarchico, con le cellule staminali poste all'apice dei differenti percorsi di sviluppo. Le cellule staminali possiedono tre proprietà peculiari: l'autorinnovamento, la capacità di sviluppo secondo molteplici linee di differenziazione, la potenzialità di un'estesa proliferazione.

In alcuni tumori (specie del tessuto ematopoietico, cervello e mammella) sono state isolate e identificate popolazioni di cellule, biologicamente distinte e quantitativamente scarse, che presentano le proprietà proprie delle cellule staminali: hanno la capacità dell'autorinnovamento, la potenzialità di generare qualsiasi cellula dell'intera popolazione tumorale, l'abilità di proliferare dando origine ad una continua espansione delle cellule maligne. Queste cellule, indicate come "*tumor-initiating cells*", vengono oggi definite con il termine di "cellule staminali tumorali". Soprattutto la loro attitudine all'autorinnovamento appare importante per l'oncogenesi e la malignità (Al-Hajj e Clarke, 2004).

I modelli proposti per la proliferazione tumorale sono due:

- 1) il modello stocastico e
 - 2) il modello delle cellule staminali.
- 1) Nel modello stocastico le cellule del tumore sono eterogenee, e ogni cellula ha una bassa ma uguale probabilità di proliferare estesamente e di formare nuovi tumori. Quindi non possono essere isolate consistenti sottopopolazioni di *tumor-initiating cells*. Secondo questo modello le mutazioni genetiche che portano allo sviluppo ed alla progressione del tumore sono operative in tutte le cellule del tumore stesso. Gli approcci terapeutici oggi convenzionali sono diretti verso la massa tumorale, e sono largamente basati su questo modello.
 - 2) Nel modello delle cellule staminali le cellule del tumore sono eterogenee, ma la maggior parte delle cellule hanno un limitato potenziale proliferativo e solo una piccola sottopopolazione ha la capacità di iniziare una nuova crescita tumorale. Secondo questo modello tali cellule staminali tumorali sono biolo-

gicamente e funzionalmente distinte dalle cellule della massa tumorale, e debbono costituire il bersaglio specifico del trattamento antitumorale per poter raggiungere la guarigione. L'attendibilità di questo secondo modello è sostenuta dai risultati delle più recenti ricerche (Wang e Dick, 2005).

Alcuni studi hanno inoltre dimostrato che cellule staminali tumorali possono derivare anche da cellule progenitrici che hanno subito la mutazione neoplastica (Jamieson et al., 2004; Krivtsov et al., 2006). Questi progenitori (conosciuti anche come "*transit-amplifying cells*") possiedono una sostanziale capacità replicativa, ma usualmente non hanno la capacità di autorinnovamento propria delle cellule staminali. Per diventare una cellula staminale tumorale, una cellula progenitrice deve acquisire le mutazioni che le fanno riguadagnare la proprietà dell'autorinnovamento. Quindi molteplici percorsi e processi possono dare origine a cellule staminali tumorali.

Considerando la biologia del tumore, un concetto fondamentale è quindi che una piccola popolazione di cellule (con le caratteristiche di cellule staminali) è essenziale per la sua crescita. Questo concetto può presentare vari aspetti clinici: le cellule staminali tumorali sono la sorgente di tutte le cellule maligne in un tumore primitivo, esse possono costituire una piccola riserva di cellule chemioresistenti che sono responsabili di una ricaduta dopo una remissione indotta da chemioterapia, oppure esse possono dare origine a metastasi a distanza. Le caratteristiche biologiche delle cellule staminali tumorali possono essere differenti in ciascuna di queste situazioni, suggerendo che l'acquisizione di caratteristiche associate alla progressione tumorale (come l'instabilità genetica e la chemioresistenza) è un aspetto proprio della biologia delle cellule staminali.

È evidente che un trattamento antitumorale, che non elimina tutte le cellule staminali neoplastiche, può consentire la ricrescita del tumore. Nei casi di scomparsa di una massa tumorale dopo chemioterapia, ma successiva ricaduta, è plausibile ritenere che le cellule staminali tumorali non siano state completamente distrutte. Ne consegue che strategie terapeutiche specificamente dirette contro le cellule staminali tumorali per ottenerne l'eradicazione, risultano essere più efficaci dei trattamenti convenzionali che consentono solo un controllo della massa tumorale.

Cellule staminali leucemiche

Lo studio dell'ematopoiesi normale e leucemica è stata la via maestra per lo sviluppo di tutta la ricerca oncologica. I progressi nello studio delle cellule staminali umane normali e leucemiche sono stati fortemente aiutati dalla procedura degli xenotrapianti in topi NOD/SCID, in cui cellule staminali umane possono ripopolare i tessuti ematopoietici di topi profondamente immunodeficienti (Wang et al., 2001).

Il trapianto di cellule leucemiche umane nel topo NOD/SCID genera nel ricevente una malattia che ricapitola la malattia umana, e consente di purificare e identificare le cellule staminali leucemiche. Ad esempio, con tale procedura sono state isolate nel topo cellule staminali di leucemia acuta mieloide (LAM) umana, deno-

minate *SCID leukemia-initiating cells* (SL-ICs). La frazione di cellule CD34+ CD38-, che rappresenta dallo 0,1 all'1% delle popolazioni leucemiche, contiene la totalità delle SL-ICs. Le frazioni di cellule CD34- e CD34+ CD38+, che comprende la maggior parte della massa leucemica, non contiene SL-ICs, sebbene tali frazioni contengano progenitori leucemici clonogenici capaci di accrescimento *in vitro*. Così, questi studi hanno dimostrato in modo conclusivo che il clone leucemico è organizzato come una gerarchia in cui solo un piccolo sottogruppo di cellule leucemiche possiede la capacità di iniziare il clone dopo trapianto, e che queste SL-ICs sono distinte dai progenitori clonogenici che possono essere saggiati *in vitro*, e che blasti non-clonogenici compongono la maggior parte del clone leucemico (Dick, 2003).

Le cellule staminali della LAM sono in maggior parte quiescenti (Guan et al., 2003), suggerendo che probabilmente i convenzionali trattamenti citotossici anti-proliferativi sono inefficaci contro di esse. Le cellule staminali di LAM presentano marcatori di superficie, come il recettore per l'IL-3 β -catena, che non sono presenti sulle cellule normali (Jordan, 2002). Questi marcatori possono essere utili per impostare regimi terapeutici basati sull'impiego di anticorpi specifici. Anche peculiari aspetti molecolari potrebbero fornire l'opportunità per intervenire con specifici provvedimenti terapeutici.

Cellule staminali leucemiche sono state evidenziate anche nella leucemia mieloide cronica (LMC), ne è stato ben descritto il fenotipo e riconosciuto lo stato di quiescenza del ciclo cellulare (Holyoake et al., 2002). Sono state condotte parecchie ricerche sui farmaci che specificamente intervengono sui percorsi molecolari dell'accrescimento leucemico, e l'uso dell'imatinib melinato (Gleevec) inibitore dell'ABL-chinasi per il trattamento della LMC ha dato risultati particolarmente interessanti (Deininger et al., 2005). Tuttavia, nonostante le importanti risposte cliniche raggiunte con l'imatinib, in molti pazienti persiste una malattia residua. Studi *in vitro* indicano che l'inibizione del prodotto di traslocazione BCR-ABL è sufficiente a eradicare quasi tutte le cellule leucemiche, ma il farmaco non sembra uccidere le cellule staminali della LMC (Graham et al., 2002). Infatti, la LMC usualmente riprende quando la terapia con imatinib viene interrotta (Cortes et al., 2004). Anche il nuovo farmaco dasatinib, efficace nei casi di LMC resistenti all'imatinib, sembra fallire nell'eliminare la frazione quiescente di cellule staminali (Copland et al., 2006).

Cellule staminali dei tumori solidi

L'isolamento di cellule staminali tumorali del sistema nervoso centrale (SNC) è stato ottenuto con l'impiego di marcatori antigenici ed utilizzando condizioni culturali *in vitro* sviluppate per le cellule staminali neurali normali. Come è stato descritto per la prima volta da Reynolds e Weiss (1992), le cellule staminali del SNC crescono in coltura non-aderenti a superfici, dando origine a sfere di cellule (neurosfe) che hanno la capacità di automantenimento e possono generare tutti i principali tipi di cellule nervose (neuroni, astrociti, oligodendrociti). Le neurosfere, nelle quali viene mantenuto il compartimento delle cellule staminali,

possono essere suddivise nelle singole cellule; una piccola frazione di queste può generare una nuova neurosfera. Questa capacità di ripetere generazioni di neurosfere da singole cellule è generalmente ritenuta una prova di automantenimento (Seaberg e van der Kooy, 2003).

Studi recenti hanno dimostrato che le cellule staminali nervose normali esprimono una proteina di superficie che può essere evidenziata con un anticorpo diretto contro l'epitopo CD133 (Uchida et al., 2000), un marcatore comunemente trovato sulle cellule staminali e progenitori in vari tessuti (Shmelkov et al., 2005).

L'applicazione di procedure utilizzate per ottenere neurosfere da campioni di gliomi umani (Galli et al., 2004) e la purificazione di cellule CD-133 positive da glomi umani (Singh et al., 2003) hanno consentito l'isolamento e la crescita di popolazioni di cellule staminali tumorali. In entrambi i casi la popolazione di cellule staminali tumorali è stata essenziale per generare un tumore *in vivo*. Il trapianto di circa 100 cellule CD133-positive di glioma umano nel cervello di topi immunodeficienti ha dato inizio allo sviluppo di un glioma, mentre nessun tumore è originato dal trapianto di 10^5 cellule CD133-negative ottenute dagli stessi tumori (Singh et al., 2004).

Il terzo tumore umano nel quale sono state isolate e identificate cellule staminali tumorali è il cancro della mammella. Ricerche condotte da Al-Hajj et al. (2003) su campioni ottenuti da pazienti con tumore della mammella metastatico in fase avanzata hanno dimostrato che cellule con uno specifico profilo di antigeni di superficie (CD44+ e CD24-) potrebbero automantenersi stabilmente come xenotrapianti tumorali. Questi esperimenti, condotti in topi immunodeficienti, hanno consentito di osservare (analogamente a quanto già rilevato con le cellule staminali di leucemia e di glioma) che solo un sottogruppo relativamente scarso di cellule staminali tumorali può propagare il tumore *in vivo*, mentre la maggior parte delle cellule maligne fallisce nel ripetere il tumore. Inoltre, cellule CD44+ CD24- possono differenziare e dare origine a cellule simili a quelle ritrovate nelle popolazioni della massa tumorale.

L'identificazione delle caratteristiche delle cellule staminali mammarie, sia normali che tumorali, è proceduta molto rapidamente in questi ultimi anni. Di grande aiuto è stato lo sviluppo di metodiche di colture *in vitro*, basate sull'abilità di queste cellule di proliferare in sospensione come mammosfere non-aderenti (Dontu et al., 2003; Ponti et al., 2005). L'isolamento e la caratterizzazione biologica di queste cellule potrebbe consentire di chiarire i percorsi molecolari che governano lo sviluppo mammario normale e la cancerogenesi.

Prospettiva di una nuova terapia antitumorale

Le recenti conoscenze sulle cellule staminali tumorali hanno portato a una nuova strategia nella lotta antitumorale: soltanto la completa eliminazione delle cellule staminali tumorali può portare alla guarigione del tumore stesso. Un importante obiettivo attuale è quindi lo sviluppo di trattamenti specificamente diretti contro il bersaglio delle cellule staminali tumorali, ma le sfide sono formidabili (Jordan et al., 2006).

La prima sfida riguarda la considerazione che per disegnare trattamenti che selettivamente consentano di eradicare le cellule staminali tumorali è necessario avere conoscenze precise sulle cellule staminali normali. Questo passaggio richiede lo sviluppo di test che caratterizzino le cellule staminali normali e di metodiche che ne consentano l'isolamento. Strade simili debbono essere percorse anche per le cellule staminali tumorali e le tecniche utilizzate debbono essere validate. Senza queste conoscenze è impossibile sapere se un farmaco in esame è tossico solo per le cellule staminali tumorali o anche per le cellule staminali normali.

Un punto critico è capire come le cellule staminali tumorali differiscono dalle cellule staminali normali, in particolare per quanto riguarda i meccanismi che controllano la sopravvivenza cellulare e la resistenza agli insulti citotossici. Idealmente una terapia dovrebbe essere diretta univamente verso i percorsi usati dalle cellule staminali tumorali per resistere agli insulti estrinseci e per mantenere una vitalità in stato di quiescenza.

Un'altra sfida è capire come sia tanto difficile distruggere le cellule staminali tumorali. Le cellule staminali leucemiche risiedono in gran parte in uno stato di quiescenza rispetto al ciclo cellulare, come avviene per la loro controparte normale. È quindi improbabile che regimi citotossici, che hanno come tipico bersaglio cellule che si dividono rapidamente, possano eradicare le cellule staminali leucemiche. Sono quindi necessari regimi selettivi che distruggano le cellule indipendentemente dal ciclo cellulare, oppure che inducano selettivamente le cellule staminali tumorali ad entrare in ciclo.

Infine, una considerazione deve essere riservata alle recidive. Se viene raggiunta una remissione clinica, la presenza di cellule staminali tumorali chemioresistenti può dare inizio ad una ricaduta. Debbono quindi essere migliorati i metodi per evidenziare e quantificare le cellule staminali tumorali residue in pazienti già sottoposti a terapia antitumorale. I risultati ottenuti in pazienti con LAM indicano che il livello di malattia residua correla direttamente con il decorso a lungo termine (Feller et al., 2004); se il numero delle primitive cellule leucemiche viene ridotto sotto determinati livelli soglia, potrebbe non essere necessario eliminare completamente il clone maligno. Certamente questo dato deve essere controllato; comunque, suggerisce che la ricerca di metodi attendibili e sensibili per l'evidenziamento e la quantificazione della malattia minima residua costituisce senz'altro una priorità.

Bibliografia

1. Dick JE. Breast cancer stem cells revealed. PNAS, 100, 3547, 2003.
2. Wang J.C.Y., Dick J.E. Cancer stem cells: lessons from leukaemia. Trends in Cell Biology, 15, 494, 2005
3. Al-Hajj M., Becker MW., Wicha MS. et al. Therapeutic implications of cancer stem cells. Curr. Opin. Genet. Dev., 14, 43, 2004.
4. Al-Hajj M., Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. Oncogene, 23, 7274, 2004.
5. Jordan CT. Targeting the mostcritical cells: approaching leukaemia therapy

- as a problem in stem cell biology. *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 2,224, 2005.
6. Jordan CT., Guzman ML., Noble M. Cancer stem cells. *N. Engl. J. Med.* 355, 1253, 2006.
 7. Jamieson CH., Ailles LE., Dylla SJ. et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N. Engl. J. Med.*, 351, 657, 2004.
 8. Krivtsov AV., Twomey D., Feng Z. et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*, 442, 818, 2006.
 9. Wang JC., Dorrell C., Ito CY. et al. In: *Hematopoiesis: Developmental Approach*. Ed. Zon L.I., Oxford Univ. Press, New York, 99-118, 2001.
 10. Guan Y., Gerhard B., Hogge DE. et al. Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukaemia (AML). *Blood*, 101, 3142, 2003.
 11. Jordan CT. Unique molecular and cellular features of acute myelogenous leukaemia stem cells. *Leukemia*, 16, 559, 2002.
 12. Holyoake TL., Jiang X., Drummond MW. et al. Elucidating critical mechanisms of deregulated stem cell turnover in the chronic phase of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*, 16, 549, 2002.
 13. Deininger M., Buchdunger E., Druker B.J. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukaemia. *Blood*, 105, 2640, 2005.
 14. Graham S.M., Jorgensen H.G., Allan E. et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukaemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood*, 99, 319, 2002.
 15. Cortes J., O'Brien S., Kantafjian H. et al. Discontinuation of imatinib therapy after achieving a molecular response. *Blood*, 104, 2204, 2004.
 16. Copland M., Hamilton A., Elrick L.J., et al. Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood*, 107, 4532, 2006.
 17. Reynolds BA., Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255, 1707, 1992.
 18. Seaberg RM., van der Kooy D. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosc.* 26, 125, 2003.
 19. Uchida N., Buck DV., He D. et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *PNAS*, 97, 14720, 2000.
 20. Shmelkov SV., St Clair R., Lyden D. et al. AC133/CD133/Prominin-1. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 37, 715, 2005.
 21. Galli R., Binda E., Orfanelli U. et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer res.*, 64, 7011, 2004.
 22. Singh SK., Clarke ID., Terasaki M. et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.*, 63, 5821, 2003.
 23. Singh SK., Hawkins C., Clarke ID. et al. Identification of human brain tumor initiating cells. *Nature*, 432, 396, 2004.

24. Al-Hajj M., Wicha MS., Benito-Ernandez A. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *PNAS*, 100, 3983, 2003.
25. Dontu G., Abdallah, WM., Foley JM. et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes & Development*, 17, 1253, 2003.
26. Ponti D., Costa A., Zaffaroni N. et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.*, 65, 5506, 2005.
27. Feller N., van der Pol MA., van Stijn A. et al. MRD parameters using immunophenotypic detection methods are highly reliable in predicting survival in acute myeloid leukaemia. 18, 1380, 2004.

Cellule staminali nel tumore della mammella

Maria Grazia Daidone, Claudi Casarsa, Alice Reduzzi, Nadia Zaffaroni

Unità Operativa Ricerca Traslazionale, Dipartimento di Oncologia Sperimentale e Laboratori, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano

Nei tessuti adulti normali, il mantenimento della popolazione cellulare si deve ad una piccola frazione di cellule, le cellule staminali, che si dividono asimmetricamente autorinnovandosi e dando origine a progenitori cellulari che, dopo un numero limitato di divisioni, producono cellule differenziate tessuto-specifiche, non più in grado di dividersi. È ampiamente accertato che i tumori sono entità eterogenee per quanto riguarda il potenziale proliferativo, fenotipico e tumorigenico, e recentemente si è dimostrato che esiste, all'interno della massa neoplastica, una frazione numericamente esigua di cellule (1-2% dell'intera popolazione tumorale) che è la sola in grado di rigenerare il tumore *in vivo*, mentre popolazioni di cellule più differenziate mancano di questa proprietà. Tali cellule sono simili alle cellule staminali per alcune caratteristiche, quali l'autorinnovamento, lo stato indifferenziato, la multipotenzialità (ovvero la capacità di generare cellule mature appartenenti a diversi stiptipi cellulari). In base a queste e ad altre evidenze sperimentali si è così giunti a ritenere che il tumore origini da una cellula staminale adulta, anziché da una qualsiasi cellula somatica, oppure da una cellula che riacquisisce caratteristiche di staminalità, e in tale contesto lo sviluppo della neoplasia viene ad essere considerato un'organogenesi aberrante originata e sostenuta da cellule staminali mutate, denominate cellule staminali tumorali.

La dimostrazione formale della presenza di una frazione di cellule autorinnovantesi che, seppur esigua, è in grado di rigenerare il tumore si è inizialmente avuta nella leucemia mieloide acuta grazie alla disponibilità di sistemi sperimentali per l'identificazione dei fenotipi caratterizzanti i differenti stiptipi cellulari (1) e alla dimostrazione della capacità di ripopolazione delle cellule staminali leucemiche in idonei modelli murini (2). Recentemente sono state messe a punto condizioni sperimentali per l'isolamento e la propagazione di cellule staminali/progenitori anche da neoplasie solide, e si è così giunti alla dimostrazione dell'esistenza di cellule con elevato potenziale tumorigenico oltre che nei mielosi (3) nei tumori del sistema nervoso centrale (4-6). Utilizzando tecniche impiegate per l'isolamento di cellule staminali da tessuto normali (basate su un approccio prospettico - quale l'iso-

lamento in base all'espressione di marcatori di superficie o alla capacità di escludere il colorante vitale Hoechst 33342, o retrospettivo - quale la crescita clonale *in vitro* come sfere non adese) sono state isolate da carcinomi della mammella (7, 8), dell'ovaio (9), della prostata (10), da melanomi maligni (11) e, più recentemente, da tumori del colon (12, 13) e della testa e collo (14) cellule che presentano alcuni dei caratteri di staminalità e che - diversamente dalla popolazione cellulare di origine - sono in grado di dar origine a tumore quando inoculate nell'animale a concentrazioni molto basse (Tabella 1). Si è inoltre dimostrato che la frazione con caratteristiche di staminalità è quantitativamente modesta, e che la restante popolazione cellulare è destinata a differenziamento e senescenza.

Mentre cellule staminali normali e tumorali condividono molte caratteristiche molecolari e funzionali, la regolazione dell'autorinnovamento cellulare attraverso i pathways di Wnt, BMI-1, Notch, Hedgehog, operativo e strettamente controllato nelle cellule staminali normali, è del tutto alterata nelle cellule staminali tumorali e la conoscenza delle alterazioni molecolari che lo sostengono (e che già caratterizzano molte neoplasie solide e sistemiche) viene ad essere cruciale per l'identificazione di bersagli molecolari per interventi terapeutici potenzialmente altamente selettivi. Gli attuali trattamenti, disegnati principalmente contro le cellule proliferanti, sono infatti indirizzati ad una riduzione dell'intera massa tumorale e non necessariamente ad un annientamento della frazione staminale/tumorigenica caratterizzata - per contro - da una elevata espressione di proteine appartenenti alla famiglia dei trasportatori di membrana ABC (che favoriscono l'ef-

Tab. 1 - Isolamento da tumori umani di cellule staminali/progenitori ad elevato potenziale tumorigenico

Tipo tumorale	Metodo/marcatore utilizzato per l'isolamento	Riferimento bibliografico
Leucemia mieloide acuta	CD34+CD38- lineage-	Bonnet & Dick, Nat Med 1997
Mieloma multiplo	CD138-/CD134-	Matsui et al., Blood 2004
Tumori cerebrali	CD133+ Crescita <i>in vitro</i> come sfere in sospensione	Singh et al., Nature 2004 Hemmati et al., PNAS 2003 Galli et al., Cancer Res 2004
Carcinoma mammario	CD44+CD24-/basso lineage- Crescita <i>in vitro</i> come sfere in sospensione	Al-Hajj et al., PNAS 2003 Ponti et al., Cancer Res 2005
Carcinoma prostatico	CD44+/a2b1high/CD133+	Collins et al., Cancer Res 2005
Carcinoma ovarico	Crescita <i>in vitro</i> come sfere in sospensione	Bapat et al., Cancer Res 2005
Carcinoma del colon	CD133+	Ricci-Vitiani et al., Nature 2007 O'Brien et al., Nature 2007
Tumori del cavo orale	CD44+ lineage-	Prince et al., PNAS 2007
Melanoma	Crescita <i>in vitro</i> come sfere in sospensione	Fang et al., Cancer Res 2005

flusso cellulare di farmaci), da alterazioni nei meccanismi di riparazione del DNA, dalla presenza di fattori citoprotettivi, quali attivazione della telomerasi ed elevata espressione di fattori anti-apoptotici, e da una relativamente modesta velocità di crescita a fronte di un elevato potenziale proliferativo. Il trattamento, pertanto, malgrado provochi una significativa riduzione della massa tumorale (attualmente considerata indicatore di risposta clinica ovvero di sopravvivenza del paziente) può lasciare del tutto inalterata la frazione di cellule staminali tumorali, in grado quindi di proliferare e rigenerare la neoplasia sia a livello locale sia a distanza. Per l'eradicazione del tumore è ipotizzabile sia quindi necessario bersagliare direttamente la cellula staminale tumorale/progenitore tumorigenico. A tale scopo sono in corso studi per identificare le alterazioni molecolari che sostengono in maniera funzionalmente non ridondante l'autorinnovamento delle cellule ad elevato potenziale tumorigenico e per disegnare e validare a livello preclinico molecole che interferiscano su tali targets.

Per quanto riguarda il carcinoma della mammella è stato recentemente dimostrato il significato prognostico di alterazioni molecolari a carico di pathways coinvolti nell'autorinnovamento. In particolare:

Wnt: inizialmente implicato nella tumorigenesi e nel mantenimento di un pool di cellule staminali/progenitori nella ghiandola mammaria murina, recentemente ha dimostrato la sua importanza anche nelle neoplasie umane. È coinvolto in un cross-talk con i recettori per gli ormoni steroidei attraverso pathways comuni e si è dimostrato che l'interferenza sulla sua funzionalità attraverso antagonisti specifici o siRNA aumenta l'espressione di marcatori di differenziamento. Risultanti discordanti sono stati riportati sul ruolo prognostico di *Wnt5a* (15-17) mentre la localizzazione intracellulare di β -catenina (18) differentemente associata con il decorso della malattia (favorevole per l'espressione citoplasmatica, sfavorevole per l'espressione nucleare) e la metilazione del promotore di *SFRP-1* (secreted frizzled-related protein-1) è un indicatore indipendente di prognosi sfavorevole (19, 20).

Hedgehog: alterazioni di questo pathway sono implicati nella sviluppo di differenti patologie neoplastiche, inclusa la patologia mammaria. In particolare, *Sonic Hedgehog* identifica carcinomi mammari infiammatori a differente aggressività biologica (21), mentre la ciclopamina, un alcaloide che interferisce specificamente sul pathway di *Hedgehog*, riduce l'espressione di *Gli1* e rallenta significativamente la crescita tumorale (22).

BMI-1 è uno dei componenti del complesso Polycomb indotto attraverso il pathway di segnalazione di *hedgehog* responsabile dell'autorinnovamento di cellule staminali normali e leucemiche, reprime geni che inducono senescenza e morte cellulare, e immortalizza cellule dell'epitelio mammario umano. *BMI-1* mostra una elevata espressione nelle cellule di carcinoma mammario che crescono sotto forma di sfere non adese, e un profilo molecolare basato sull'espressione di 11 geni presenti nel pathway di *BMI-1* sembra essere un forte e solido indicatore prognostico, in termini sia di ripresa globale che di metastasi a distanza e di morte, indipendente dal trattamento, in 11 neoplasie epiteliali e non, comprendenti anche il carcinoma mammario (23).

Notch: ha un ruolo importante in diverse patologie neoplastiche (24): Notch 4 è associato alla tumorigenesi murina e alla proliferazione delle mammosfere (ovvero, delle cellule staminali/progenitori che crescono in sospensione come sfere non adese), tanto che il trattamento con un anticorpo diretto contro Notch 4 sopprime drasticamente la formazione di sfere sia primarie sia secondarie (25). Notch1 e 2 sono rispettivamente fattori prognostici favorevoli e sfavorevoli nei tumori clinici (26, 27).

Sono attualmente disponibili le prime evidenze sperimentali che dimostrano l'efficacia di nuovi agenti terapeutici sull'autorinnovamento di cellule staminali/progenitori normali (24, 25, 28). Tuttavia, la situazione è molto più complessa di quanto non appaia da questi incoraggianti risultati preliminari. Infatti, come ottimamente messo in evidenza in uno Special Workshop Report recentemente pubblicato su *Cancer Research* (66: 9339-9344, 2006, ref. 29):

- 1) la definizione di cancer stem cell è squisitamente operativa (cellula in grado di autorinnovarsi e dar luogo a stipiti cellulari differenti, in grado di rigenerare continuamente un tumore);
- 2) l'isolamento e la propagazione di cellule staminali/progenitori è estremamente difficile - in mancanza di marcatori che chiaramente identificano la staminalità come nel caso di leucemie e tumori cerebrali - nei tumori solidi e si basa essenzialmente su saggi funzionali in vivo e su condizioni sperimentali non propriamente fisiologiche;
- 3) la crescita in vivo richiede una complessa standardizzazione e tempi di crescita molto lunghi, ovvero condizioni difficilmente utilizzabili per uno screening farmacologico su larga scala;
- 4) per contro, un saggio in vitro deve essere *a)* standardizzato e riproducibile, *b)* quantitativo, *c)* altamente specifico, *d)* sufficientemente sensibile, *e)* rapido.

Oltre a queste condizioni, ancora largamente da mettere realmente a punto nella pratica di laboratorio, restano ancora molti quesiti, sia speculativi sia tecnici, a cui rispondere prima di poter valutare quanto le conoscenze sulla biologia delle cellule staminali/progenitori di cellule tumorali possono contribuire ad una diagnosi precoce, ad una precisa identificazione dei tumori aggressivi e indolenti e allo sviluppo di molecole mirate contro alterazioni molecolari associate alla staminalità tumorale.

Tuttavia, le più recenti pubblicazioni aventi come oggetto informazioni acquisite dalla caratterizzazione molecolare (30) e dal profilo di radiosensibilità (31) di cellule staminali/progenitori isolate da tumori clinici così come da linee cellulari stabilizzate da carcinoma mammario forniscono un concreto supporto alla prospettiva di applicabilità clinica di questi studi. Infatti, il profilo di espressione genica derivato da cellule con caratteristiche di staminalità isolate da 6 tumori clinici si dimostra predittore di sopravvivenza globale e libera da malattia non solo su casistiche di carcinoma mammario, ma anche su neoplasie di differente istologia, quali il carcinoma polmonare e prostatico e il medulloblastoma. Inoltre, esiste una prima dimostrazione formale, ottenuta da mammosfere propagate *in vitro*, che cellule con caratteristiche di staminalità sono relativamente più radio-resistenti della popolazione da cui sono state isolate.

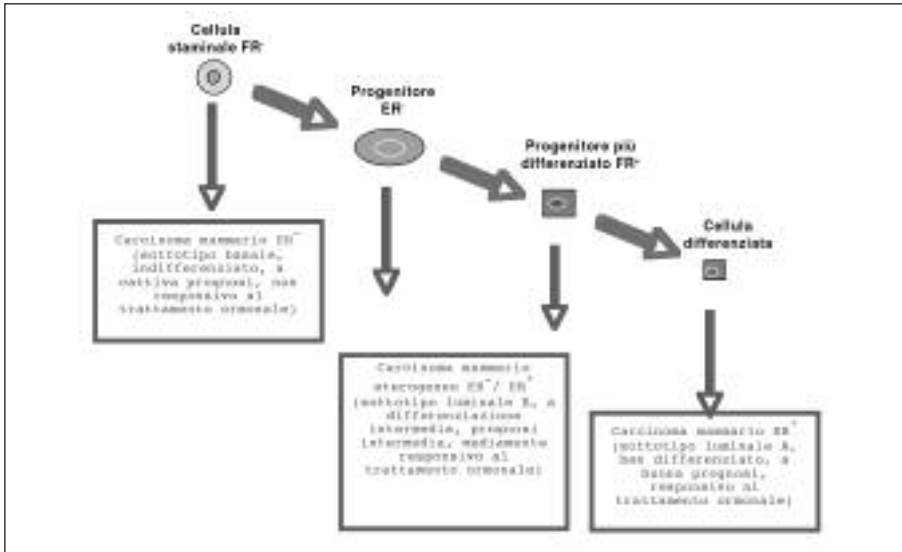


Fig. 1 - Relazione tra grado di ipertrofia miocardica quantificato come spessore parietale massimo misurato all'ecocardiografia e rischio di morte improvvisa.

Per quanto riguarda la cellula staminale della ghiandola mammaria, recenti evidenze depongono per una sua negatività recettoriale e per la presenza di recettori per estrogeni (ER) nei progenitori e nelle cellule più differenziate. Il momento dello stadio di differenziamento del lineage cellulare al quale corrisponde la trasformazione neoplastica viene ad essere determinante per la storia clinica della neoplasia (Figura 1). Infatti, se la trasformazione neoplastica insorge nella cellula staminale, senza recettori per estrogeni, è verosimile che il tumore sarà di tipo basale, indifferenziato, a prognosi sfavorevole e poco responsivo alle terapie ormonali. Per contro, un tumore generato da cellule ben differenziate, apparterrà verosimilmente al sottotipo luminale A, caratterizzato da buona prognosi ed elevata probabilità di risposta al trattamento ormonale. Ovviamente, al progenitore parzialmente differenziato corrisponderà un tumore con un comportamento clinico e biologico estremamente eterogeneo.

Bibliografia

1. Siminovitch et al. *J Cell Physiol* 1963; 62: 327-36.
2. Bonnet D., Dick JE. *Nat Med* 1997; 3: 730-7.
3. Matsui W., et al. *Blood* 2004; 103: 2332-6.
4. Hemmati et al., *PNAS* 2003; 100: 15178-83.
5. Singh S., et al. *Nature* 2004; 432: 396-401.
6. Galli et al., *Cancer Res* 2004; 64: 7011-21.
7. Al-Hajj M., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 3983-8.
8. Ponti D., et al. *Cancer Res* 2005; 65: 5506-11.

9. Bapat SA., et al. *Cancer Res* 2005; 65:3025-9.
10. Collins AT., et al. *Cancer Res* 2005; 65: 10946-51.
11. Fang D., et al. *Cancer Res* 2005; 65: 9328-37.
12. Ricci-Vitiani L., et al. *Nature* 2007; 445: 111-5.
13. O'Brien CA., et al. *Nature* 2007; 445: 106-10.
14. Prince ME., et al. *PNAS* 2007; 104: 973-8.
15. Dejmek J., et al. *Clinical Cancer Res* 2005; 11: 520-8.
16. Jonsson R., et al. *Cancer Res* 2002; 62: 409-16.
17. Leris AC., et al. *Anticancer Res* 2005; 25: 731-4.
18. Nakapoulou L., et al. *Mod Pathol* 2006; 19: 556-63.
19. Lo PK., et al. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 281-6.
20. Veeck J., et al. *Oncogene* 2006; 25: 3479-88.
21. Bièche I., et al. *Clinical Cancer Res* 2004; 10: 6789-95.
22. Kubo M., et al. *Cancer Res* 2004; 64: 6071-4.
23. Glinisky GV., et al. *J Clin Invest* 2005; 115: 1503-21.
24. Stylianou S., et al. *Cancer Res* 2006; 66: 1517-25.
25. Dontu G., et al. *Breast Cancer Res* 2004; 6: 605-15.
26. Parr C., et al. *Int J Mol Med* 2004; 4: 779-86.
27. Reedijk M., et al. *Cancer Res* 2005; 65:8530-7.
28. Liu M. et al., *Cancer Res* 2006; 66: 6063-71.2007
29. Clarke MF., et al. *Cancer Res* 2006; 66: 9339-44.
30. Liu R., et al. *N Engl J Med* 2007; 356: 217-26.
31. Phillips TM., et al. *J Natl Cancer Inst* 2006;98 :1777-85.

Colorectal cancer stem cells, MET and metastasis

Carla Boccaccio

IRCC, Istituto per la Ricerca e la Cura del Cancro, Candiolo Università di Torino

One model of tumour growth proposes that tumours are structured in a hierarchical form, with a majority of cells undergoing aberrant differentiation but retaining a proliferative capacity limited over time, and a tiny subset of cancer stem cells (CSCs). The latter should be the only tumour cells able to self-renew, to initiate and propagate tumour development. An opposing model suggests that every cell within a tumour has the capacity to initiate and sustain tumour growth (reviewed in 1, 2).

The first model is supported by prospective isolation of CSCs from several human tumours, including leukaemia (3), breast carcinoma (4), tumours of the central nervous system (5)⁵, and, recently, from colorectal cancer. In the latter case, two independent groups (6, 7) showed that not every cell derived from human colorectal cancer can form tumours after transplantation in the mouse. Using antibodies directed against the cell surface marker CD133, the two groups could isolate CD133 overexpressing cells (CD133⁺) from colorectal cancer. Only CD133⁺ cells were able to significantly induce tumours in the primary recipient mice, and in secondary and tertiary recipients. Moreover, only CD133⁺ cells had the capacity to re-establish the patterns of differentiation and marker expression of the original tumour, including downregulation of CD133 expression in the majority of tumour cells. Thus, these reports convincingly showed that colorectal cancers contain a CSC subset included in the CD133⁺ subpopulation (6, 7).

Isolation of CSCs from colorectal cancer and other tumours is an important step towards understanding and defeating metastasis, the most lethal cancer complication. Theoretically, CSCs should be the only cells able to produce secondary tumours (metastasis), because of their unique clonogenic and self-renewal properties (8). Moreover (ii) CSCs should be able to execute a motile programme to reach a distant site (9). The origin of metastasis by CSCs is consistent with the renowned inefficiency of the metastatic process (10). In fact, although many cancer cells detach from the primary tumour and migrate throughout the organism, only CSCs can found a new cancer “colony”. The origin of metastasis from CSCs could also explain pioneering observation such as (i) the origin of metastasis from

pre-existing variants within a malignant tumour and (ii) the unchanged metastatic potential of cells of the secondary site with respect to those of the primary tumour (11). In fact, the CSC theory predicts that the new colony re-establish the same hierarchical structure as the primary tumour. Thus, if tumours indeed contain CSCs, these must be targeted by tumour therapies in order to completely eradicate metastatic cancer, and to prevent recurrence of any kind of tumour.

To counteract metastasis, besides identifying CSCs, it is equally important to understand which mechanisms regulate CSC mobilization and spread throughout the organism. It has been recently proposed that trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells likely entail common mechanisms, involving for instance the chemokine stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and its G-protein-coupled receptor CXCR4 (12). Similarly, HGF signalling through its receptor, the tyrosine kinase encoded by the MET oncogene, could play a similar role in driving mobilization and emigration of both normal and cancer stem cells. HGF controls a genetic programme called "invasive growth". The signalling cascade initiated by MET instructs cells to detach from a primary colony, to cross tissue boundaries, to adhere to and migrate through extracellular matrices, and to escape death caused by an unfamiliar tissue context (anoikis). Invasive growth is a physiological process leading to morphogenesis and tissue regeneration during development and adult life. However, inappropriate activation of MET can confer to cancer cells the ability to invade and metastasize, as shown in experimental systems, and in patients, where MET activation associates with aggressive cancer (13).

Much evidence suggests that the invasive growth programme might be executed by stem and progenitor cells¹⁴. It is known that, in the embryo, normal stem/pre-cursor cells express MET and migrate to accomplish their developmental fate in response to HGF. This is observed in primary endoderm, primitive streak, notochord, somites and neural crest (reviewed in 14). A striking example is that of skeletal muscle: in the mouse, the expression of MET by myoblasts and of HGF by the mesenchyme of limb buds are absolute requirements to induce myoblast delamination from somites, migration to the limbs, and muscle formation (15). In the adult, bone marrow contains stem/progenitor cells that express MET and, in response to HGF gradients, migrate to injured tissues, such as liver, skeletal muscle and myocardium, where they participate in repair (reviewed in 14¹⁴). HGF and MET are both expressed by adult human mesenchymal stem cells, and HGF stimulate their chemotactic migration (16, 17). Interestingly, in some adult tissues, MET expression is preferentially localized, and sometimes even restricted to stem/progenitor cells. In bone marrow, MET is expressed by a small subset (0.6%) of total cells, half of which are CD34⁺, that is included in the stem/progenitor cell population (18). In skeletal muscle, MET is not expressed in differentiated myofibers, but it is expressed by their associated stem cells, the satellite cells (19). A similar situation occurs in cardiac muscle (20).

The GI tract is a representative model to study the involvement of MET in the generation and/or spread of cancer stem cells. *In vivo* genetic experiments have shown that HGF and MET are essential for embryonic liver development (15, 21,

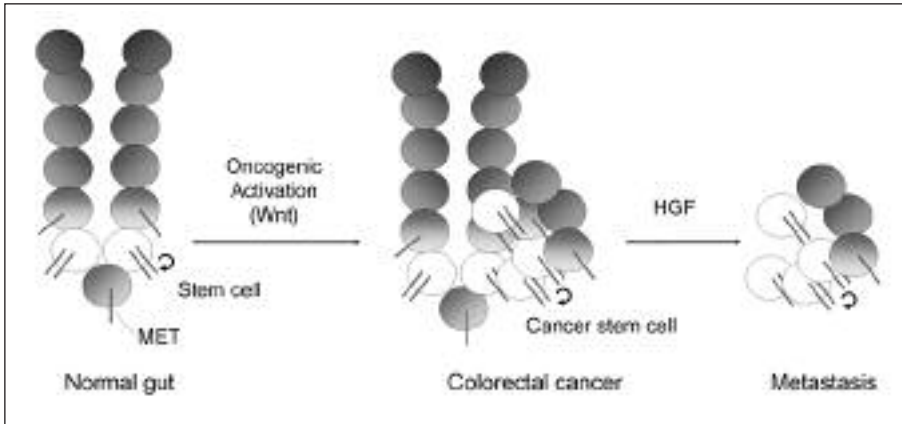


Fig. 1

22). During both development and post-natal life, MET is expressed only at low levels by differentiated hepatocytes. On the contrary, MET is a marker for liver stem cells, which has been used for their prospective isolation from murine fetal livers (24). Interestingly, these stem cells can generate the two epithelial liver lineages (hepatocytes and cholangiocytes), as well as pancreatic and intestinal cells (24). MET has been used as a marker also for prospective isolation of stem cells resident in the pancreas (25), while it is barely expressed by pancreatic differentiated cells (26). In the small and large intestine, MET is preferentially expressed in the crypts, where stem and progenitor cells are located (27, 28). Clinical studies show that a high percentage of tumours from the GI tract overexpress MET and that overexpression correlates with metastatic potential and poor prognosis (29-32). Thus MET overexpression could be a marker of expansion of a population of cancer stem/progenitor cells.

In a high percentage of colorectal cancer, the primary oncogenic event is the constitutive activation of the Wnt pathway, through loss of the APC tumour suppressor gene, or activation of β -catenin (reviewed by 33). Physiological Wnt signalling is a main regulator of colorectal stem cell self-renewal. It has been proposed that Wnt activation can convert a normal into a cancer stem cell, and support expansion of the cancerous stem/progenitor compartment (34). In physiological conditions, Wnt binds to a transmembrane receptor (Frizzled) that, as result, prevents the activity of a cytoplasmic multiprotein complex including APC, which targets β -catenin for degradation. Thus, in the presence of Wnt, β -catenin accumulates and translocates into the nucleus, where it binds and activates transcription factors of the TCF family. Deregulated activation of TCFs occurs if β -catenin is hyperactivated, or if APC is inactivated by mutations. Transcription of several genes follows, including those crucial for stem cell self renewal. Interestingly, among the genes induced by Wnt, and thus conceivably expressed by colorectal stem cells and cancer stem cells, there is MET (35, 36). If, as debated, CSCs retain (or "reacquire") the properties of normal stem cells

of the tissue from which they derive, it is conceivable to assume that MET expression will enable CSC to perform the invasive growth programme. Interestingly, this property could be completely independent of the MET ability to transform the cells, that is the “classical” oncogenic ability. In the case of colorectal cancer, Wnt constitutive activation is the primary oncogenic event, which concomitantly sustains cancer stem cell transformation and MET expression. HGF, present in the extracellular matrix or expressed by specific tissues such as the liver, can form gradients that guide cancer stem cells towards a secondary location (Figure 1).

Bibliografia

1. Reya T., Morrison SJ., Clarke MF. & Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111, 2001.
2. Huntly BJ. & Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat. Rev. Cancer* 5, 311-321, 2005.
3. Bonnet D. & Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730-737, 1997.
4. Al Hajj M., Wicha MS., Benito-Hernandez A., Morrison SJ. & Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 3983-3988, 2003.
5. Singh SK. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401, 2004.
6. O'Brien CA., Pollett A., Gallinger S. & Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2006.
7. Ricci-Vitiani L. et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2006.
8. Clarke MF. & Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell* 124, 1111-1115, 2006.
9. Brabletz T., Jung A., Spaderna S., Hlubek F. & Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 5, 744-749, 2005.
10. Chambers AF., Groom AC. & MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2, 563-572, 2002.
11. Fidler IJ. & Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 197, 893-895, 1977.
12. Kucia M. et al. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells* 23, 879-894, 2005.
13. Birchmeier C., Birchmeier W., Gherardi E. & Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 915-925, 2003.
14. Boccaccio C. & Comoglio PM. Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat. Rev. Cancer* 6, 637-645, 2006.
15. Bladt F., Riethmacher D., Isenmann S., Aguzzi A. & Birchmeier C. Essential

- role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376, 768-771, 1995.
16. Forte G. et al. Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation. *Stem Cells* 24, 23-33, 2006.
 17. Neuss S., Becher, E., Woltje M., Tietze L. & Jahnen-Dechent, W. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells* 22, 405-414, 2004.
 18. Galimi F. et al. Hepatocyte growth factor induces proliferation and differentiation of multipotent and erythroid hemopoietic progenitors. *J. Cell Biol.* 127, 1743-1754, 1994.
 19. Cornelison DD. & Wold BJ. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev. Biol.* 191, 270-283, 1997.
 20. Urbanek K. et al. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ. Res.* 97, 663-673, 2005.
 21. Schmidt C. et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373, 699-702, 1995.
 22. Uehara, Y. et al. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 373, 702-705, 1995.
 23. Zheng YW. & Taniguchi H. Diversity of hepatic stem cells in the fetal and adult liver. *Semin. Liver Dis.* 23, 337-348, 2003.
 24. Suzuki A. et al. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J. Cell Biol.* 156, 173-184, 2002.
 25. Suzuki A., Nakauchi H. & Taniguchi H. Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes* 53, 2143-2152, 2004.
 26. Di Renzo MF., Poulson R., Olivero M., Comoglio PM. & Lemoine NR. Expression of the Met/hepatocyte growth factor receptor in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* 55, 1129-1138, 1995.
 27. Di Renzo MF. et al. Expression of the Met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues. *Oncogene* 6, 1997-2003, 1991.
 28. Prat M. et al. The receptor encoded by the human c-MET oncogene is expressed in hepatocytes, epithelial cells and solid tumors. *Int. J. Cancer* 49, 323-328, 1991.
 29. Di Renzo MF. et al. Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 1, 147-154, 1995.
 30. Suzuki K. et al. Expression of the c-met protooncogene in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 20, 1231-1236, 1994.
 31. Takeuchi H. et al. c-MET expression level in primary colon cancer: a predictor of tumor invasion and lymph node metastases. *Clin. Cancer Res.* 9, 1480-1488, 2003.

32. Ueki T., Fujimoto J., Suzuki T., Yamamoto H. & Okamoto E. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met proto-oncogene, in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 25, 619-623, 1997.
33. Fodde R., Smits R. & Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 55-67, 2001.
34. van de Wetering M. et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111, 241-250, 2002.
35. Boon EM., van der NR., van de WM., Clevers H. & Pals ST. Wnt signaling regulates expression of the receptor tyrosine kinase met in colorectal cancer. *Cancer Res.* 62, 5126-5128, 2002.
36. Rasola, A. et al. A positive feedback loop between hepatocyte growth factor receptor and beta-catenin sustains colorectal cancer cell invasive growth. *Oncogene*. 2006.



Tipografia Viscontea
Via Riviera, 39 - 27100 Pavia
Tel. 0382/526253 r.a. - Fax 0382/423120

