

CELLULE STAMINALI E MEDICINA RIGENERATIVA 2009: ATTUALITÀ E PROSPETTIVE

8° CORSO DI FORMAZIONE AVANZATA

16-20 MARZO 2009, COLLEGIO GHISLIERI, PAVIA





Sommario

Cellule staminali e medicina rigenerativa 2009: attualità e prospettive	1
cellule staminali ematopoietiche	3
cellule staminali tessuto specifiche	4
cellule staminali mesenchimali	4
cellule staminali midollari e riparazione del danno tissutale	5
prospettive di terapia cellulare in cardiologia	5
cellule staminali per riparare un danno renale	6
ruolo delle cellule staminali mesenchimali nella terapia della sclerosi laterale amiotrofica	7

CELLULE STAMINALI

Da circa dieci anni la ricerca sulle cellule staminali (CS) cerca di far luce sui meccanismi molecolari alla base della *Staminalità*, quella singolare proprietà delle cellule che permette loro di rinnovarsi in modo permanente mentre, contemporaneamente, vanno incontro a specifici programmi di differenziazione cellulare. Così, a partire dagli approcci storici prevalentemente dovuti alle conoscenze legate agli studi sulla ematopoiesi si è via via giunti a comprendere che la staminalità è una funzione più che una caratteristica temporalmente legata ad un gruppo di cellule ed a un momento fisiologico di un tessuto. Ciò ha costituito una svolta paradigmatica nelle riflessioni sulle strategie da impiegarsi per giungere ad ottenere quantità utili di cellule, di tipi cellulari specifici, per la sostituzione di quelle danneggiate o morte a causa sia di processi fisiologici o patologici o traumatici. Il cambio di paradigma concettuale ha avuto conseguenze chiare per la biologia delle cellule staminali: dalla ricerca di sempre nuove sorgenti di CS, si è giunti alla convinzione che sia possibile evocare la staminalità anche in cellule differenziate grazie all'impiego di alcuni geni o di miscele di fattori citoplasmatici estratti da cellule uovo o da cellule embrionali. Il mantenimento o l'acquisizione della staminalità da parte di una cellula è l'interazione tra la cellula e il suo microambiente. La ricerca di fattori legati alla pluripotenza ed alla capacità di rinnovo iniziò con l'impiego di studi di genomica funzionale tesi ad individuare i patterns di espressione di geni che potessero in qualche modo essere legati alla funzione di staminalità. I risultati ottenuti portarono all'identificazione di alcuni geni definiti stemness quali: Oct 3 /4 , Sox2, c-myc e Klf4. Senza questi studi non sarebbe stato possibile comprendere l'avanzamento delle conoscenze che ha portato a quella che è forse la più rilevante delle scoperte recenti: l'impiego da parte del ricercatore *Yamanaka* dei fantastici quattro (Oct 3 /4 , Sox2, c-myc e Klf4) per indurre la pluripotenza in cellule terminalmente differenziate. Questo avanzamento delle conoscenze ha enormi implicazioni terapeutiche per la medicina rigenerativa poiché apre le porte alle terapie personalizzate . Le prime linee di cellule indotte alla pluripotenza (cellule IPS) non presentavano la capacità di contribuire alla linea germinale: ora siamo in grado di produrre linee IPS capaci di una simile operazione, sempre impiegando gli stessi quattro fattori ma con l'aggiunta della espressione del gene Nanog. Quest'ultimo contribuisce fondamentalmente a modificazioni epigenetiche della conformazione della cromatina, permettendo una diversa accessibilità all'espressione di altri geni , aprendo cioè quella regolazione della staminalità basata sulle circuiterie geniche. La più promettente applicazione in ambito biomedico delle tecniche di riprogrammazione delle funzioni del genoma è certamente quella della produzione di popolazioni cellulari di veri e propri tessuti da trapianto differenziati ad hoc. Per le diverse patologie si può prevedere di differenziare in vitro i tipi cellulari necessari per la terapia da attuare. Questa via sebbene non ancora applicabile in tutte le sue tappe, sicuramente offre una prospettiva per milioni di pazienti affetti da patologie degenerative o croniche la cui incidenza nella popolazione è estremamente elevata. Le cellule staminali embrionali (ES) sono in grado, in specifiche condizioni di coltura, di generare nuovi tipi cellulari differenziati.

CELLULE STAMINALI TESSUTO SPECIFICHE

Le cellule staminali (CS) somatiche possono essere classificate in base ai tessuti da cui vengono isolate e raccolte. L'elenco delle cellule staminali tessuto-specifiche sinora identificate comprende cellule di origine ectodermica, mesodermica ed endodermica. Le CS adulte tessuto-specifiche hanno la capacità di continuo auto rinnovamento per tutta la durata della vita, e danno origine a vari tipi di cellule mature con funzioni ben specializzate. La funzione primaria delle CS tessuto-specifiche è quindi quella di provvedere a mantenere l'omeostasi di un tessuto, rimpiazzando le cellule mature andate distrutte per danno o malattia. Oppure anche per semplice senescenza. Le cellule staminali, la loro progenie e gli elementi del loro microambiente compongono una struttura anatomica che coordina e regola la normale produzione omeostatica di cellule funzionali mature che viene chiamata *Nicchia*. Le più studiate e le meglio conosciute sono le nicchie delle CS che, per tutta la durata della vita, provvedono alla regolare ematopoiesi e al rinnovo dell'epitelio intestinale e delle strutture epiteliali. Le CS debbono periodicamente venir attivate e produrre progenitori e cellule di transito amplificati che sono commissionate a produrre linee di cellule mature. Così il mantenere un bilanciamento fra CS quiescenti e attive è la caratteristica fondamentale di una nicchia funzionale.

CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI

Accanto alle CS ematopoietiche il midollo osseo contiene CS mesenchimali. Queste sono indicate nella letteratura internazionale con l'acronimo MSC. Sono cellule multi potenti di origine mesodermica, esistenti in parecchi organi e tessuti connettivi; soprattutto nel midollo osseo, ma anche nei polmoni, intestino, fegato, polpa dentaria, tessuto adiposo, sangue placentare e di cordone ombelicale. La loro posizione è quella di nicchia periva scolare, dove fanno da supporto ad altri tipi cellulari. La ricerca negli ultimi anni ha avuto un enorme impulso per il loro intervento nei meccanismi di riparazione tissutale.

L'International Society for Cellular Therapy (ISCT) ha fornito i criteri minimi per il riconoscimento delle MSC:

- 1) Aderenza alla plastica in condizioni colturali standard
- 2) Espressione di CD105, CD73, CD90, e mancanza dell'espressione di CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 o CD19, HLA-DR
- 3) Differenziazione in vitro in osteoblasti, adipociti e condroblasti.

Un problema ancora controverso riguarda la presenza di MSC nel sangue periferico dopo mobilizzazione con G-CSF. Infatti secondo dati comunicati dal gruppo di Hows (Hows, 2005), le MSC vengono facilmente isolate nel midollo osseo mentre sono contenute in scarsa quantità nel sangue periferico mobilizzato. In qualsiasi caso il midollo osseo appare essere la migliore sorgente di MSC, di cui oggi sono ben note le peculiari caratteristiche di bassa immunogenicità, particolarmente interessante nelle procedure trapiantologiche di riparazione tissutale anche allogeniche.

CELLULE STAMINALI MIDOLLARI E RIPARAZIONE DEL DANNO TESSUTALE

Molte ricerche hanno recentemente investigato i meccanismi che regolano il traffico delle cellule staminali midollari dal e verso, il microambiente midollare o tessuti non ematopoietici sottoposti a danno. Nonostante alcuni fattori chemio tattici come CXCL12 e interazioni chiave (ad esempio VLA-4/VCAM-1) alla base di questo fenomeno siano stati estensivamente studiati, rimane ancora molto da chiarire sui processi di homing e mobilitazione in risposta ad un danno d'organo. La famiglia dei nucleotidi trifosfato in particolare ATP e UTP, sta emergendo in modo sempre più evidente come mediatrice di molteplici funzioni biologiche, tra le quali proliferazione e differenziamento, apoptosi, necrosi, secrezioni di citochine e chemio chine, nonché fenomeni chemio tattici. Attraverso saggi funzionali in vitro è stato inoltre dimostrato che il legame di questi recettori da parte dei nucleotidi ATP e soprattutto UTP induce un incremento del potenziale proliferativo di cellule staminali sia CD34+ , che CD34-lin-, nonché l'espansione dei progenitori ematopoietici più immaturi LTC-IC (long- term culture initiating cells). Nell'insieme, quanto emerge dai saggi di migrazione in vitro ed in vivo è che il nucleotide UTP esercita un effetto di priming sui progenitori ematopoietici umani, potenziandone la risposta alla chemotassina CXCL12. Tale azione potrebbe dipendere dalla capacità dell'UTP di modulare i livelli di espressione o di attività del recettore per il CXCL12, CXCR4. Le analisi citofluorimetriche condotte separatamente su cellule migranti e non migranti suggeriscono che l'UTP possa influenzare le dinamiche farmacologiche del CXCR4, inibendone l'internalizzazione dopo legame con CXCL12. Inoltre cellule staminali trattate con UTP mostrano un incremento significativo del tasso trascrizionale di numerosi geni coinvolti nella regolazione della motilità e delle strutture cellulari adibite ai processi di migrazione. Quindi nell'homing midollare e attecchimento a breve termine un ruolo importante è svolto sia dalle proteine G, che insieme dagli UTP, che cooperano nella trasduzione di segnali coinvolti nella migrazione cellulare in seguito ad un danno tessutale.

PROSPETTIVE DI TERAPIA CELLULARE IN CARDIOLOGIA

Le malattie cardiovascolari rappresentano nel loro insieme la maggiore causa di morbilità e mortalità tra le popolazioni occidentali. In particolare lo scompenso cardiaco post-ischemico è una delle patologie più gravi e la sua prevalenza è in continua crescita poiché l'età media delle popolazioni occidentali è in aumento e le terapie disponibili, pur migliorando l'aspettativa di vita non sono curative. Il trapianto cardiaco è ad oggi l'unico trattamento in grado di salvare la vita a molti pazienti; tuttavia, la scarsità di donazioni, il rigetto acuto o cronico dell'organo ricevuto e i problemi legati alla terapia antirigetto rendono questo approccio ampiamente insufficienti per far fronte a tale drammatica condizione. Per tutti questi motivi esiste un urgente bisogno di nuovi e rivoluzionari interventi terapeutici in grado di indurre la regressione del rimodellamento ventricolare post-ischemico. In questa ottica, una terapia cellulare rigenerativa/curativa che utilizzi cellule staminali adulte (ASCs) autologhe rappresenta una delle più grandi promesse. I tipi cellulari fino ad ora studiati a livello sperimentale includono cellule mononucleate di derivazione midollare (BM-MNCs), cellule midollari non frazionate (BMCs), cellule staminali ematopoietiche (HSCs), cellule progenitrici endoteliali (EPCs), cellule staminali mesenchimali (MSCs) e cellule cardiache staminali (CSCs).

Ma come agiscono le cellule staminali? La rigenerazione cardiaca derivata dalla transdifferenziazione delle ASCs in cardiomiociti e cellule endoteliali è stata proposta come principale meccanismo d'azione. Tuttavia, di recente è stato dimostrato che la maggior parte delle cellule di derivazione midollare non avrebbe in realtà un grande potere rigenerativo. Nel caso delle HSCs poi la capacità di trans differenziare in cardiomiociti è stata addirittura messa in forte dubbio. Recentemente è stato ipotizzato che fenomeni di fusione cellulare tra

cardiomiociti nativi e cellule staminali trapiantate possano giustificare in parte i risultati ottenuti in modelli animali. A prescindere dal fatto che la generazione di nuovi cardiomiociti avvenga per trans differenziazione o fusione cellulare, è stato dimostrato che il numero di cardiomiociti rigenerati è troppo limitato per poter giustificare una ripresa funzionale significativa come quella osservata dopo trattamento con ASCs. Di conseguenza, è stato ipotizzato che i benefici anatomici e funzionali osservati in cuori infartuati dopo trattamento con ASCs potrebbe in realtà essere in parte dovuti alla secrezione di fattori solubili da parte delle cellule trapiantate che agendo per via paracrina, sarebbero in grado di proteggere il cuore, indurre neovascolarizzazione, ridurre il rimodellamento ventricolare, aumentare la contrattilità, migliorare il metabolismo cardiaco e promuovere la rigenerazione miocardica endogena. A supporto dell'ipotesi paracrina è stato dimostrato che le ASCs, in modo particolare le MSC, producono e secernono un elevato numero di citochine, chemiochine e fattori di crescita. Un altro importante effetto biologico positivamente influenzato per via paracrina è il processo di neovascolarizzazione. E' noto che vari tipi di ASCs possono essere incorporati all'interno di strutture vascolari e differenziare in cellule endoteliali mature e cellule muscolari lisce. Tuttavia, il numero di cellule incorporate è estremamente basso e non tale da poter giustificare l'aumento di vascolarizzazione e flusso. Di per conto, i fattori solubili rilasciati dalle ASCs, come VEGF, bFGF e Angiopietine, possono agire anche a livello della matrice extracellulare e condizionare in modo favorevole il processo di rimodellamento ventricolare. Le MSCs per esempio producono un elevato numero di molecole coinvolte nella biogenesi della matrice extracellulare. Non meraviglia quindi la scoperta che la somministrazione di MSCs può ridurre la deposizione di tessuto fibrotico nel cuore ed in altri organi quali il fegato, polmoni e reni. La dimostrazione che le ASCs sono in grado di produrre e secernere sostanze terapeutiche rappresenta una scoperta molto importante dal momento che, piuttosto che trapiantare cellule, in futuro potremmo essere in grado di somministrare specifiche proteine o altri fattori solubili.

CELLULE STAMINALI PER RIPARARE UN DANNO RENALE

Molti studi sono stati fatti per identificare la presenza di popolazioni di progenitori/ cellule staminali del rene. Rimane ancora controversa la loro localizzazione e caratteristiche. Utilizzando diversi approcci metodologici sono state identificate cellule progenitrici renali con diverse caratteristiche nel tubulo, nello spazio peritubulare, nella papilla renale e nella capsula di Bowman. Cellule staminali renali multi potenti, isolate dalla frazione tubulare di reni di ratto, che esprimevano marker come CD90, Oct4, Pax2, erano in grado di stimolare la rigenerazione renale e ridurre il danno se iniettate in animali con IRA da ischemia/riperfusione. Nella papilla renale sono state isolate cellule BrdU positive, multi potenti capaci quando iniettate di integrarsi nei tubuli danneggiati in seguito ad un danno acuto. Una popolazione diversa definita *Side population* forse di origine ematopoietica è stata isolata dal rene con capacità di differenziarsi in diversi tipi cellulari oltre che renali. Inoltre cellule CD133 isolate dal rene che esprimevano marcatori come CD29, CD90, CD44, CD73 e Oct4, erano in grado di differenziare in cellule endoteliali e epiteliali. Recentemente in reni adulti umani la capsula di Bowman glomerulare è stata identificata una nuova nicchia per cellule staminali multi potenti che se iniettate in topi con IRA esercitavano un effetto protettivo sulla funzione e stimolavano la rigenerazione renale.

I primi studi condotti su cellule MSC come possibile terapia in modelli cronici di malattie renali, hanno evidenziato che in topi con IRA l'infusione di MSC da midollo osseo è in grado di migliorare la funzione renale e di preservare la struttura tubulare. Le cellule mesenchimali che arrivano al rene danneggiato erano poche (1 cellula MSC/10⁵ cellule renali) e solo 8% di queste si trovavano all'interno dei tubuli e acquisivano un fenotipo tubulare. Il trattamento con mesenchimali stimolava marcatamente la proliferazione delle cellule tubulari positive per il marker nucleare Ki-67, suggerendo che probabilmente le MSC esercitavano il loro effetto protettivo a livello renale soprattutto attraverso un'azione paracrina. Infatti è stata osservata una riduzione a livello locale dell'apoptosi, una stimolazione della proliferazione delle cellule renali tubulari e una preservazione della microcircolazione renale. Il potenziale renotropico e rigenerativo delle MSC umane è stato

chiaramente dimostrato, confermando che le MSC rappresentano una popolazione cellulare ideale per future terapie cellulari e per una possibile applicazione clinica in pazienti con IRA.

RUOLO DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI NELLA TERAPIA DELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA), è una patologia degenerativa del sistema nervoso centrale che interessa selettivamente i motoneuroni sia centrali che periferici. La morte progressiva e irreversibile dei motoneuroni si traduce sul piano clinico in una progressiva plegia di tutta la muscolatura spinale e bulbare, che si manifesta con disfagia, disartria, perdita del controllo dei muscoli scheletrici fino all'exitus generalmente determinato dall'insufficienza respiratoria nell'arco di 2 o 5 anni dall'esordio. I trials clinici farmacologici, attualmente in corso, mirano da un lato a ridurre i danni neuronali utilizzando fattori di crescita nervosi e dall'altro a preservare l'integrità cellulare residua attraverso l'utilizzo di farmaci ad azione antiossidante. I risultati soddisfacenti nei modelli sperimentali sono assai poco confortanti nell'uomo. La terapia cellulare con cellule staminali può rappresentare un nuovo approccio terapeutico nella SLA. Recenti studi hanno evidenziato che il trapianto di cellule staminali potrebbe avere effetti benefici piuttosto che sostituendo i motoneuroni danneggiati, migliorando il microambiente e producendo fattori trofici. Per studiare la capacità delle MSC isolate da midollo osseo di differenziare in senso neurale sono stati condotti studi in vitro e vivo. I risultati ottenuti da due protocolli sperimentali di fase I che prevedevano l'uso di MSC autologhe isolate da midollo osseo in pazienti affetti da SLA, sono stati rassicuranti in quanto è stata osservata un rallentamento della progressione della malattia già dopo 3 mesi dal trapianto. Pertanto le MSC possono rappresentare una buona fonte cellulare per intraprendere nuove strategie terapeutiche di terapia cellulare per malattie degenerative.

