

APPLICAZIONI TERAPEUTICHE DELLE CELLULE STROMALI MIDOLLARI

CARMELO CARLO-STELLA

UNITÀ TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO ISTITUTO NAZIONALE TUMORI - MILANO

INDIRIZZO

Dr. Carmelo Carlo-Stella
Unità Trapianto di Midollo
Istituto Nazionale Tumori
Via Venezian, 1
20133 Milano
E-mail: ccs@ipruniv.cce.unipr.it

In aggiunta alle cellule staminali emopoietiche (HSCs) in grado di generare progenitori orientati verso la maturazione terminale, il midollo osseo contiene cellule staminali non-emopoietiche di tipo mesenchimale (1) e di tipo epiteliale (2). Le “*cellule staminali mesenchimali*” (MSCs), dotate di capacità di automantenimento e di pleiotropica capacità differenziativa in senso osteoblastico, condrocitario, adipocitario, mioblastico e fibroblastico sono anche denominate “*cellule stromali midollari*”, data la loro capacità di generare le cellule del microambiente midollare (3,4). Le cellule stromali del microambiente midollare sono fortemente eterogenee essendo costituite oltre che dalla progenie delle MSCs anche da cellule endoteliali e macrofagi (questi ultimi benchè generati dalla HSC vengono considerati componenti funzionali dello stroma) (5,6). Dal punto di vista funzionale, le cellule mesenchimali e non-mesenchimali del microambiente midollare e i loro prodotti biosintetici giocano un ruolo fondamentale nella regolazione della proliferazione e differenziazione emopoietica. Le cellule stromali sintetizzano fattori di crescita e citochine regolatrici, esprimono molecole adesive e producono proteine della matrice extracellulare che compartimentalizzano le molecole regolatrici (7,8). Benchè citochine e fattori di crescita svolgano un ruolo cruciale nella regolazione della proliferazione e differenziazione emopoietica, appare improbabile che l'emopoiesi sia regolata da una miscela casuale di fattori di crescita e cellule target (9). E' verosimile che molecole regolatorie e fenomeni di localizzazione a livello dello stroma midollare siano essenziali per regolare l'emopoiesi. Benchè le conoscenze circa i fattori stromali in grado di modulare lo sviluppo di cellule emopoietiche lungo le varie filiere differenziative siano relativamente limitate, appare evidente che le cellule del microambiente midollare sono coinvolte non solo nella regolazione della proliferazione e differenziazione mieloide ma anche in quella T e B linfoide attraverso tre modalità operative: (i) interazioni cellula-cellula; (ii) interazioni tra cellule emopoietiche e molecole della matrice extracellulare; (iii) interazioni tra cellule emopoietiche e citochine regolatrici (5).

Il ruolo esatto che le cellule del microambiente, le molecole adesive e le proteine della matrice extracellulare svolgono nella localizzazione e organizzazione spaziale delle

cellule emopoietiche e nella regolazione della ricostituzione mieloide e linfoide dopo trapianto di cellule staminali emopoietiche (SCT) rimane oggetto di ipotesi (10). Studi nel topo hanno dimostrato che cellule staminali e progenitrici emopoietiche hanno una peculiare distribuzione lungo la cavità midollare del femore suggerendo una suddivisione del microambiente midollare in aree funzionalmente distinte (“microambiente primario” e “microambiente secondario”) che condizionano distinte modalità differenziative delle cellule staminali emopoietiche (11). L’esistenza di aree microambientali primarie e secondarie è supportata dagli esperimenti di Schofield (12) che dimostrano un ruolo delle cellule microambientali nel mantenere la cellula staminale emopoietica in condizioni quiescenti e suggeriscono l’esistenza della “nicchia della cellula staminale”. Un altro meccanismo che supporta il concetto di aree specializzate del microambiente è rappresentato dalla produzione compartimentalizzata di fattori di crescita (9). Fattori di crescita prodotti localmente dalle cellule stromali si legano a strutture della matrice extracellulare e vengono presentati alle cellule target che riconoscono ciascun fattore attraverso specifici recettori (9). Questo meccanismo consente di localizzare in aree specifiche del microambiente elevate concentrazioni di specifici fattori di crescita. Allo stato attuale, poco si conosce circa i fattori stromali in grado di modulare la differenziazione emopoietica. Un crescente numero di evidenze suggerisce che la stroma midollare è implicato non solo nella regolazione della proliferazione delle cellule mieloidi ma anche nello sviluppo T e B linfocitario (13-16). Specifiche molecole di adesione e citochine sono in grado di regolare la B e T linfopoiesi stroma-dipendente (17,18) suggerendo che lo stroma midollare possa funzionare come sede extra-timica di T e B linfopoiesi.

L’esistenza della MSC in grado di auto-mantenersi è supportata da molti dati in vivo e in vitro (19). A livello funzionale, le MSCs che risiedono nel microambiente midollare sono in grado di generare uno stroma midollare complesso sia in vivo che in vitro e hanno capacità differenziativa multilineare essendo infatti capaci di generare progenitori con potenziale differenziativo ristretto alla filiera fibroblastica, osteoblastica, adipocitaria, condrocitaria e mioblastica (20-22). In assenza di un

sistema di coltura in grado di quantificare la MSC, l'unica classe di progenitori mesenchimali attualmente saggiabile in vitro è rappresentata dalle CFU-F (fibroblastic colony-forming cells) (23). Le CFU-F generano in vitro colonie di differente taglia e potenziale proliferativo morfologicamente costituite da cellule di tipo fibroblastico le quali sono in grado, in presenza di appropriati stimoli, di differenziare in senso adipocitario (22) o osteoblastico (24) e sono in grado di generare uno spettro completo di cellule mesenchimali se trapiantate sotto la capsula renale di un ricevente singenico ("stromal stem cell hypothesis") (20,25-28). Un saggio non clonogenico per lo stroma midollare è rappresentato dalle colture a lungo termine tipo Dexter che generano uno stroma complesso costituito dai diversi tipi di cellule mesenchimali che compongono il microambiente midollare.

Prerequisito per l'uso clinico di cellule mesenchimali è la possibilità di isolare progenitori mesenchimali e di espanderli ex vivo in condizioni di coltura standardizzate. L'isolamento e l'espansione ex vivo di progenitori mesenchimali risiede nella disponibilità di anticorpi (es., STRO-1, SH-2) non cross-reattivi con l'antigene CD34 e capaci di riconoscere una sottopopolazione di cellule midollari in grado di generare in vitro stromi midollari completi e funzionalmente attivi (29,30). Nessuno degli anticorpi attualmente disponibili è specifico per le MSCs.

L'importante ruolo delle cellule mesenchimali nella regolazione del sistema emopoietico è dimostrato da molteplici evidenze cliniche e sperimentali. Nel modello di trapianto in utero (IUT) nella pecora, è stato dimostrato che la reinfusione combinata di cellule staminali emopoietiche e cellule stromali midollari aumenta significativamente i livelli di attecchimento di cellule del donatore (31). Nel modello di IUT nel topo NOD/SCID, il potenziale di attecchimento delle cellule staminali fetali viene abrogato se il ricevente viene irradiato prima del trapianto suggerendo che il microambiente midollare esercita un ruolo cruciale nell'attecchimento mielo-linfo-poietico (32). Nell'uomo, un tipico modello di alterazione del microambiente midollare che condiziona una ridotta elasticità funzionale dell'emopoiesi si realizza dopo trapianto di cellule staminali emopoietiche. In questa condizione, oltre ad una

significativa riduzione della frequenza di progenitori emopoietici primitivi e orientati, si osserva una marcata riduzione della capacità delle cellule mesenchimali di supportare l'emopoiesi allogenica o autologa (33-36).

Il ruolo dello stroma midollare nella regolazione emopoietica e le peculiari caratteristiche funzionali delle cellule mesenchimali consentono di ipotizzare numerose applicazioni cliniche dei progenitori mesenchimali generati ex vivo (Tabella 1). Le MSCs potrebbero essere utilizzate in associazione o meno a cellule staminali emopoietiche allo scopo di 'rigenerare' il microambiente midollare danneggiato dalla chemio-radioterapia o per migliorare la ricostituzione mieloide e linfoide dopo trapianto di cellule staminali. Inoltre, le caratteristiche funzionali delle MSCs (quiescenza, radio-resistenza, attività metabolica, capacità di compartimentalizzare la produzione di citochine e di interagire in modo selettivo con le cellule emopoietiche) le rendono un target di rilevante interesse in strategie di terapia genica (es., in pazienti affetti da deficit enzimatici o proteici) (37). Dati recenti dimostrano che le MSCs sono in grado di modulare la risposta proliferativa di linfociti T allogenici in vitro e suggeriscono un ruolo per le cellule stromali nella modulazione del rigetto e nella prevenzione della malattia da trapianto verso l'ospite (38).

Un numero molto limitato di studi clinici ha sinora esplorato l'uso in vivo delle MSCs. L'unico studio di fase I al momento pubblicato ha dimostrato che la reinfusione di MSCs è ben tollerata (39). Occorre sottolineare che a causa della limitata conoscenza della biologia delle MSCs, le applicazioni cliniche delle MSCs rimangono oggetto di ipotesi che vanno attentamente testate mediante appropriati studi preclinici e programmi clinici. Prerequisiti essenziali per l'uso clinico di cellule mesenchimali sono: (i) la possibilità di isolare progenitori mesenchimali e di espanderli ex vivo in condizioni di coltura standardizzate (40) e (ii) la dimostrazione della trapiantabilità delle MSCs.

Benchè molteplici studi nel topo e nel cane abbiano dimostrato la trapiantabilità e la

persistente attività funzionale delle cellule stromali (41-45), nell'uomo la trapiantabilità delle MSCs rimane controversa (46,47). La maggior parte dei dati generati sino a questo momento in riceventi di trapianto di midollo HLA identico hanno evidenziato che le cellule stromali non sono trapiantabili (46). Poichè nel modello murino la trapiantabilità dello stroma è strettamente legata al numero di cellule mesenchimali reinfuse, è possibile ipotizzare che lo stroma sia trapiantabile anche nell'uomo posto che un adeguato numero di progenitori mesenchimali venga reinfuso. I progressi e le sostanziali modifiche alla metodologia del trapianto di cellule staminali emopoietiche compiuti nell'ultima decade, suggeriscono la necessità di rivalutare il problema della trapiantabilità delle MSCs. Uno studio recentemente condotto in riceventi trapianto allogenico T-depleto reinfusi con cellule midollari e cellule da sangue periferico ha dimostrato la trapiantabilità di progenitori stromali la cui progenie è stata studiata mediante i polimorfismi del gene HUMARA e mediante ibridizzazione in situ in fluorescenza per il cromosoma Y (Carlo-Stella C & Tabilio A, manoscritto in preparazione).

In conclusione, lo studio della biologia delle MSC appare ancora ad uno stadio iniziale e molti aspetti devono essere adeguatamente esplorati prima che si possa procedere, in condizioni cliniche appropriate, a valutare l'impatto terapeutico delle MSC nel contesto di strategie di terapia cellulare e terapia genica.

BIBLIOGRAFIA

1. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276:71-74
2. Petersen, B. E.; Bowen, W. C.; Patrene, K. D.; Mars, W. M.; Sullivan, A. K.; Murase, N.; Boggs, S. S.; Greenberger, J. S.; Goff, J. P.: Bone Marrow as a Potential Source of Hepatic Oval Cells. *Science* 1999; 284:1168-1170
3. Scott MA, Gordon MY. In search of the haemopoietic stem cell. *Br J Haematol* 1995; 90: 738-743
4. Gronthos S, Simmons PJ. The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. *J Hematotherapy* 1996; 5: 15-23
5. Dexter TM. Regulation of hemopoietic cell growth and development: experimental and clinical studies. *Leukemia* 1989; 3: 469-474
6. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997; 88: 287-298
7. Trentin JJ. Influence of hematopoietic organ stroma (hematopoietic inductive microenvironments) on stem cell differentiation, in Gordon AS (ed): *Regulation of Hematopoiesis* (vol 1). New York, NY, Appleton, 1970, p 161-185
8. Simmons PJ, Zannettino A, Gronthos S, Leavesley D. Potential adhesion mechanisms for localisation of haemopoietic progenitors to bone marrow stroma. *Leukemia and Lymphoma* 1994; 12: 353-363
9. Gordon MY, Riley GP, Watt SM, Greaves MF. Compartmentalization of a haemopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. *Nature* 1987; 326: 403-405
10. Carlo-Stella C, Tabilio A. Stem cells and stem cell transplantation. *Haematologica* 1996; 81: 573-587
11. Gordon MY. Physiological mechanisms in BMT and haemopoiesis - revisited. *Bone Marrow Transplant* 1993; 11: 193-197
12. Schofield R. The relationship between the haemopoietic stem cell and the spleen colony-forming cell: a hypothesis. *Blood Cells* 1978; 4: 7-25
13. McGinnes K, Quesniaux V, Hitzler J, Paige C. Human B-lymphopoiesis is supported by bone marrow-derived stromal cells. *Exp Hematol* 1991; 19: 294-303
14. Landreth KS, Dorshkind K. Pre-B cell generation potentiated by soluble factors from a bone marrow stromal cell line. *J Immunol* 1988; 140: 845-852
15. Kierney PC, Dorshkind K. B lymphocyte precursors and myeloid progenitors survive in diffusion chamber cultures but B cell differentiation requires close association with stromal cells. *Blood* 1987; 70: 1418-1424
16. Touw I, Löwenberg B. Production of T lymphocyte colony-forming units from precursors in human long-term bone marrow cultures. *Blood* 1984; 64: 656-661
17. Dorshkind K, Johnson A, Collins L, Keller GM, Phillips RA. Generation of purified stromal cell cultures that support lymphoid and myeloid precursors. *J Immunol Methods* 1986; 89: 37-47
18. Barda-Saad M, Rozenszajn LA, Globerson A, Zhang AS, Zipori D. Selective adhesion of immature thymocytes to bone marrow stromal cells: relevance to T cell lymphopoiesis. *Exp Hematol* 1996; 24: 386-391

19. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-74
20. Owen ME, Cave J, Joyner CJ. Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of CFU-F. *J Cell Sci* 1987; 87: 731-739
21. Owen ME, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *CIBA Found Symp* 1988; 136: 42-60
22. Bennet JH, Joyner CJ, Triffitt JT, Owen ME. Adipocyte cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci* 1991; 99: 131-139
23. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 1980; 56: 289-301
24. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 1994; 84: 4164-4173
25. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3: 393-403
26. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, et al. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 1974; 17: 331-340
27. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, et al. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop* 1980; 151: 294-307
28. Owen M. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. *J Bone Miner Res* 1985; 3: 1-12
29. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991a; 78: 55-62
30. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998; 176: 57-66
31. Almeida-Porada G, Ascensao JL, Zanjani ED. The role of sheep stroma in human haemopoiesis in the human/sheep chimaeras. *Br J Haematol* 1996; 93: 795-802
32. Gan OI, Murdoch B, Larochele A, Dick JE. Differential maintenance of primitive human SCID-repopulating cells, clonogenic progenitors, and long-term culture-initiating cells after incubation on human bone marrow stromal cells. *Blood* 1997; 90: 641-650
33. Li S, Champlin R, Fitchen JH, Gale RP. Abnormalities of myeloid progenitor cells after "successful" bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 1984; 75: 234-241
34. Domenech J, Gihana E, Dayan A, et al. Haemopoiesis of transplanted patients with autologous marrows assessed by long-term marrow culture. *Br J Haematol* 1994; 88: 488-496
35. O'Flaherty E, Sparrow R, Szer J. Bone marrow stromal function from patients after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 207-212
36. Carlo-Stella C, Tabilio A, Regazzi E, et al. Effect of chemotherapy for acute myelogenous leukemia on hematopoietic and fibroblast marrow progenitors. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20: 465-471

37. van Beusechem VW, Kukler A, Heidt PJ, Valerio D. Long-term expression of human adenosine deaminase in rhesus monkeys transplanted with retrovirus-infected bone-marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 7640-7644
38. Klyushnenkova E, Mosca JD, McIntosh KR, Thiede MA. Human mesenchymal stem cells suppress allogeneic T cell responses in vitro: implications for allogeneic transplantation. *Blood* 1998; 92 (suppl 1): 2652 (Abs)
39. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan A. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 557-564
40. Gronthos S, Simmons PJ. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood* 1995; 85: 929-940
41. Perkins S, Fleischman RA. Hematopoietic microenvironment: origin, lineage, and transplantability of the stromal cells in long-term bone marrow cultures from chimeric mice. *J Clin Invest* 1988; 81: 1072-1077
42. Anklesaria P, Kase K, Glowacki J, et al. Engraftment of a clonal bone marrow stromal cell line in vivo stimulates hematopoietic recovery from total body irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7681-7685
43. El-Badri NS, Wang BY, Cherry, Good RA. Osteoblasts promote engraftment of allogeneic hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 1998; 26: 110-116
44. Nolte JA, Hanley MB, Kohn DB. Sustained human hematopoiesis in immunodeficient mice by cotransplantation of marrow stroma expressing human interleukin-3: analysis of gene transduction of long-lived progenitors. *Blood* 1994; 83: 3041-3051
45. Anklesaria P, Fitzgerald TJ, Kase K, Ohara A, Greenberger JS. Improved hematopoiesis in anemic Sl/Sld mice by splenectomy and therapeutic transplantation of a hematopoietic microenvironment. *Blood* 1989; 74: 1144-1151
46. Simmons PJ, Przepiorka D, Thomas ED, Torok-Storb B. Host origin of marrow stromal cells following allogeneic bone marrow transplantation. *Nature* 1987; 328: 429-432
47. Keating A, Singer JW, Killen PD, et al. Donor origin of the *in vitro* haemopoietic microenvironment after marrow transplantation in man. *Nature* 1982; 298: 280-283

Tabella 1- Potenziali applicazioni cliniche delle MSCs

Rigenerazione del microambiente midollare dopo radio-chemioterapia ad alte dosi

Accelerazione del recupero emopoietico dopo trapianto di cellule staminali

Accelerazione della ricostituzione T e B linfocitaria dopo trapianto di cellule staminali
allogeniche

Produzione compartimentalizzata di fattori di crescita e citochine

Modulazione della GvHD

Produzione di proteine
