

Staminali per la cura del tumore del pancreas: tra evidenze scientifiche e possibile trasferimento clinico

Di Giulia Golinelli, Giulia Grisendi, Carlotta Spano, Filippo Rossignoli, Massimo Dominici, Laboratorio di Terapie Cellulari, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Materno-Infantili e dell'Adulto, Università di Modena e Reggio Emilia, Policlinico di Modena

Una nuova promessa terapeutica arriva dall'utilizzo di cellule umane capaci di indurre la morte delle cellule tumorali tramite il rilascio di composti tossici.

Lo sviluppo del cancro è un processo multifattoriale che genera mutazioni in cellule sane. Il tumore è una malattia che non dipende solo dalle qualità intrinseche alle cellule tumorali, ma anche da fattori esterni a esse come il sistema endocrino e immunitario, i vasi e il metabolismo dell'organismo. Così come i tessuti normali, i tumori integrano due componenti distinte, ma interagenti: il parenchima, costituito dalle stesse cellule tumorali, e lo stroma composto da un insieme di cellule non trasformate e connettivali come cellule dei vasi, fibroblasti e cellule infiammatorie.

In condizioni non patologiche, il normale funzionamento del tessuto è strettamente governato dalla comunicazione tra questi due comparti. Al contrario, in presenza di un tumore, le cellule alterate danno risposte anomale ai segnali regolatori con conse-

guente alterazione della crescita e un costante rimodellamento dello stroma, in grado di favorire una ulteriore espansione tumorale.

Tale rimodellamento diventa rilevante nel carcinoma pancreatico, il tumore del pancreas più frequente la cui caratteristica peculiare è una crescita eccessiva dello stroma infiltrante che arriva a rappresentare fino al 90% dell'intero tumore. Questo microambiente fibrotico è il risultato dell'interazione reciproca che le cellule tumorali instaurano con cellule dello stroma. L'origine di tali cellule è tuttora dibattuta e vari studi sostengono che queste possano derivare sia da cellule stromali residenti nel pancreas (dette cellule stellate), sia da progenitori mesenchimali circolanti provenienti da midollo osseo e da tessuto adiposo, definiti anche cellule staminali mesenchimali.

Questo denso stroma rappresenta

non solo una barriera fisica, ma un compartimento dinamico che gioca un ruolo fondamentale nell'iniziazione e nello sviluppo tumorale, oltre che nella formazione di un microambiente fortemente immunosoppressivo e scarsamente vascolarizzato.

Tale microambiente contribuisce alla resistenza del tumore limitando l'azione del sistema immunitario e ostacolando la diffusione di agenti chemioterapici.

La ricerca di approcci alternativi caratterizzati da una migliore efficacia e scarsa tossicità ha introdotto, quale nuova promessa terapeutica, l'utilizzo di cellule umane capaci di indurre la morte delle cellule tumorali tramite il rilascio di composti tossici. Tra queste le cellule staminali mesenchimali, quali ipotetiche precursori dello stroma tumorale, hanno suscitato interesse



Laboratorio di Terapie Cellulari

per la loro applicazione come veicolo di terapia anti-tumorale.

Le cellule staminali mesenchimali sono una popolazione di progenitori multipotenti identificati per la prima volta nel 1966 nel midollo osseo e successivamente isolati da numerosi altri tessuti. In vitro si caratterizzano per la forma allungata, una spiccata capacità di crescita e la capacità di trasformarsi in cellule dell'osso, del grasso e della cartilagine. Il loro utilizzo come veicoli per la terapia genica nasce dall'evidenza che cellule staminali mesenchimali somministrate per via endovenosa

vengano reclutate preferenzialmente laddove vi sia un danno o un tumore, secondo meccanismi di attrazione non ancora del tutto chiari. In questi siti le cellule staminali mesenchimali vengono incorporate nello stroma tumorale dove esercitano una funzione di supporto alla crescita tumorale ostacolando la risposta del sistema immunitario e stimolando la nascita di nuovi vasi, l'invasività e la metastasi del tumore. Nonostante, come riportato, molti studi mostrino come le cellule staminali mesenchimali possano supportare il cancro, altri hanno

evidenziato un effetto opposto, che porta all'inibizione della crescita tumorale. Basandosi su queste evidenze, si è fatta strada l'idea di sfruttare la qualità delle cellule staminali mesenchimali di integrarsi nel microambiente tumorale, come se fossero un cavallo di Troia, e ingegnerizzarle per aumentare il loro potenziale inibitorio. I primi studi in questo senso hanno confermato la fattibilità della strategia e le cellule staminali mesenchimali sono state usate come veicoli per il trasporto mirato di fattori immunostimolanti. Lo spettro di possibili

strategie terapeutiche si è ampliato grazie all'introduzione di virus oncolitici (ovvero virus in grado di infettare selettivamente e uccidere le cellule tumorali), enzimi attivanti farmaci e ligandi di morte, come ad esempio TRAIL.

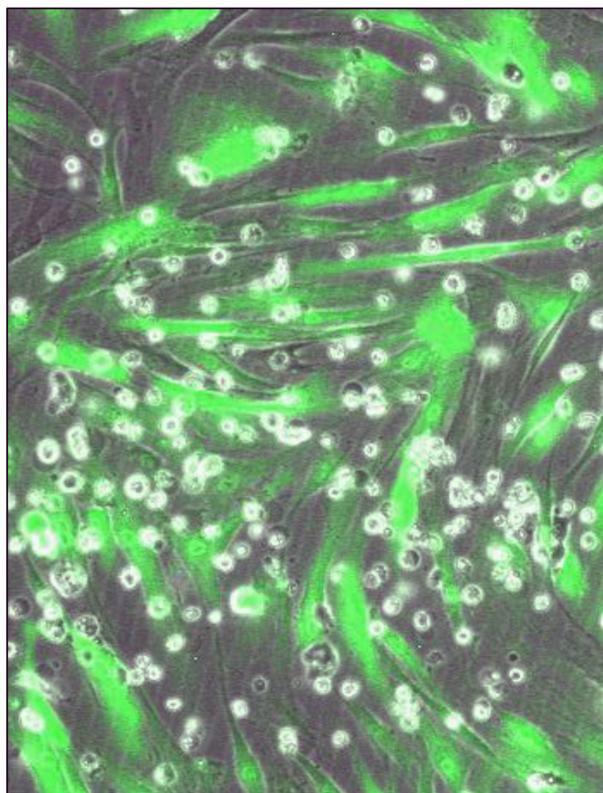
TRAIL è una proteina normalmente espressa da alcune cellule del sistema immunitario identificata nel 1995. La sua espressione circoscritta alle cellule dell'immunità suggerisce che possa contribuire alla maturazione del sistema immunitario e alla regolazione della risposta. TRAIL viene espresso in una forma legata alla membrana e una solubile, entrambe in grado di innescare la morte sulla cellula bersaglio. Per la terapia antitumorale si è rivelato un candidato promettente in virtù della sua capacità di indurre morte cellulare in svariati tipi di tumore

senza dimostrare una significativa tossicità nei confronti delle cellule sane.

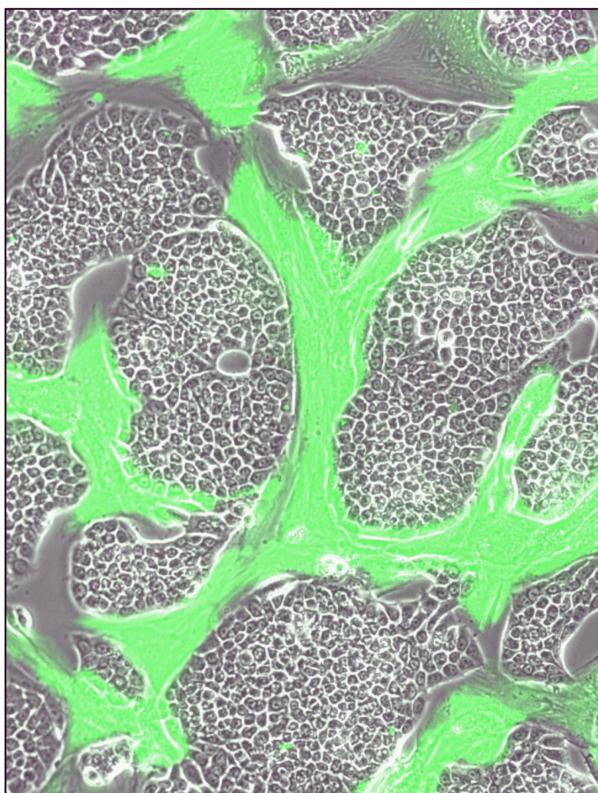
Ad oggi, diversi composti sintetici in grado di legarsi ai recettori per TRAIL e provocare la morte delle cellule tumorali si sono rivelati efficaci in studi preclinici e sono passati alla fase clinica. Sebbene tali composti si siano dimostrati ben tollerati dai pazienti, la loro efficacia antitumorale è stata al di sotto delle aspettative.

Da queste basi è nata la nostra idea di modificare geneticamente le cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo per la produzione di TRAIL, in sostanza per generare un cavallo di Troia in grado di raggiungere lo stroma tumorale e avvelenarlo. Grazie a questo approccio, la molecola viene veicolata alla neoplasia in maniera continuativa e

mirata consentendo il superamento di alcune importanti criticità dimostrate dalle terapie con i composti sintetici, come l'eccessiva diluizione della molecola nel flusso sanguigno. I nostri studi pre-clinici hanno dimostrato come questa strategia sia efficace nei confronti di tumori a elevata mortalità come il carcinoma della cervice uterina, sarcomi, tumori al colon e al pancreas. Usando due differenti modalità di somministrazione, è stato dimostrato che le cellule staminali mesenchimali esprimenti TRAIL sono in grado di migrare e integrarsi nello stroma tumorale senza generare effetti collaterali nel tessuto sano circostante. La citotossicità selettiva per le cellule tumorali è dovuta essenzialmente a un loro contatto diretto con le cellule staminali mesenchimali che, esprimendo TRAIL, innescano una



Cellule tumorali & AD-MSC TRAIL



Cellule tumorali & AD-MSC

Figura. Co-cultura tra la linea pancreatica BxPC3 e le AD-MSC esprimenti solo la proteina fluorescente verde GFP (a destra) o esprimenti GFP e TRAIL (a sinistra). Ingrandimento originale X100

cascata che porta alla morte della cellula tumorale.

Nello specifico del carcinoma pancreatico, ci siamo occupati in primo luogo dello studio dell'interazione stroma-tumore, indagando l'effetto esercitato in vitro dalle staminali sulla proliferazione di diversi tipi di tumore del pancreas, per meglio capire il ruolo delle staminali nella progressione tumorale e sviluppare nuovi approcci terapeutici. I risultati ottenuti hanno dimostrato che le citochine e i fattori di crescita normalmente secreti dalle staminali non influenzano significativamente la proliferazione delle cellule tumorali pancreatiche. Al contrario, il contatto diretto (cellula-cellula) tra le staminali e le cellule tumorali ha prodotto risultati diversi a seconda del tipo di tumore pancreatico, che richiedono ulteriori approfondimenti.

Questi studi preliminari hanno messo in luce la capacità della componente stromale di interagire con le cellule tumorali, suggerendo il loro possibile impiego come vettori per veicolare molecole ad attività antitumorale. Pertanto, abbiamo testato l'attività di cellule staminali mesenchimali geneticamente modificate per la proteina antitumorale TRAIL al fine di creare le premesse per un trattamento del tumore del pancreas. Le cellule tumorali pancreatiche sono state quindi selezionate sulla base dell'espressione dei recettori di TRAIL, ed è stata confermata la loro sensibilità a questa molecola antitumorale tramite trattamento con la forma ricombinante umana di TRAIL. Sono stati quindi allestiti altri esperimenti per verificare l'efficacia del nostro approccio di terapia cellulare basato su cellule staminali mesenchimali esprimenti TRAIL, dimostrando un potente effetto tossico su entrambe le linee tumorali pancreatiche e in particolare sul tipo di tumore mostrato nella Figura.

In conclusione, dai nostri studi si evince che una terapia cellulare con staminali esprimenti TRAIL potrebbe superare i limiti dei trattamenti chemioterapici attuali, aprendo la strada a nuove prospettive terapeutiche basate sulla manipolazione cellulare. Le fasi successive prevedono nuove validazioni del nostro approccio per poi seguire un iter autorizzativo presso gli enti regolatori per l'inizio delle fasi cliniche in pazienti che hanno ancora purtroppo una pessima prognosi.

Questi studi sono finanziati dall'Associazione Italiana Ricerca Cancro (AIRC), dall'ASEOP e dal Ministero della Salute-Bando Giovani Ricercatori 2008. ●

Riferimenti bibliografici:

1. Grivennikov, S. I. et al. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899 (2010).
2. Dvorak, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* 315, 1650–1659 (1986).
3. Chu, G.C. et al. Stromal Biology of Pancreatic Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 101, 887–907 (2007).
4. Grippo, P.J. & Munshi, H.G. Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment. Trivandrum (India): Transworld Research Network. (2012).
5. Lazennec, G. & Jorgensen, C. Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 1387–1394 (2008).
6. Reagan, M. R. & Kaplan, D. L. Concise review: Mesenchymal stem cell tumor-homing: detection methods in disease model systems. *Stem Cells Dayt. Ohio* 29, 920–927 (2011).
7. Kidd, S. et al. The (in) auspicious role of mesenchymal stromal cells in cancer: be it friend or foe. *Cytotherapy* 10, 657–667 (2008).
8. Zipori, D. et al. Stromal cell effects on clonal growth of tumors. *Cancer* 60, 1757–1762 (1987).
9. Nakamura, K. et al. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther.* 11, 1155–1164 (2004).
10. Pitti, R. M. et al. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.* 271, 12687–12690 (1996).
11. Wiley, S. R. et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673–682 (1995).
12. Gonzalez, F. & Ashkenazi, A. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene* 29, 4752–4765 (2010).
13. Stuckey, D. W. & Shah, K. TRAIL on trial: preclinical advances in cancer therapy. *Trends Mol. Med.* 19, 685–694 (2013).
14. Grisendi, G. et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells as Stable Source of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Delivery for Cancer Therapy. *Cancer Res.* 70, 3718–3729 (2010).
15. Golinelli, G. et al. Surrounding pancreatic adenocarcinoma by killer mesenchymal stromal/stem cells. *Hum Gene Ther.* 25, 406–7 (2014).