

**CELLULE STAMINALI  
STROMALI  
SORGENTI e CRESCITA  
*EX VIVO* ed *IN VIVO***

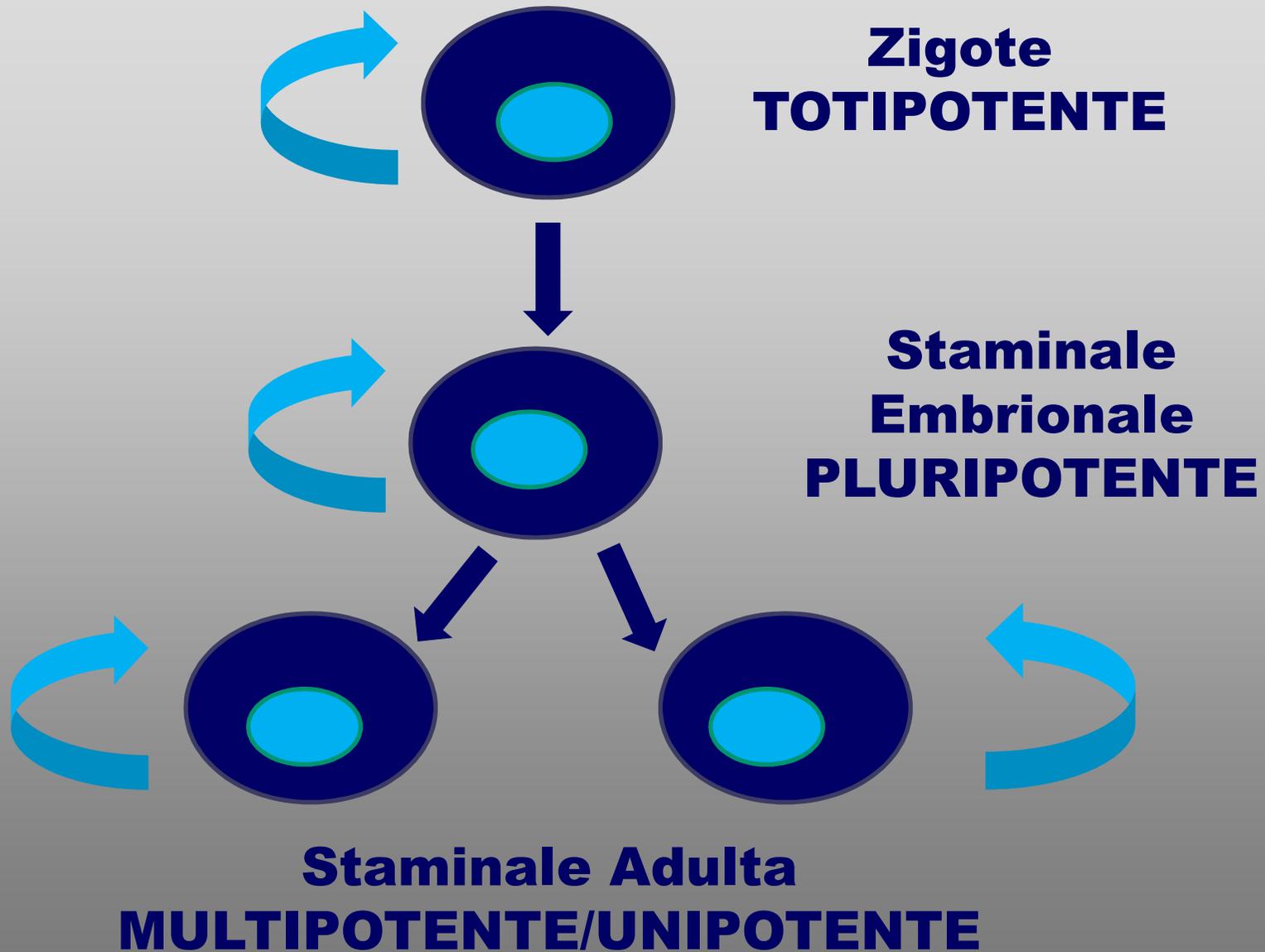
**Prof. Luca Pierelli**

Dipartimento di Medicina Sperimentale

Universita' Sapienza, Roma

AO San Camillo Forlanini, Roma

# GERARCHIA CELLULE STAMINALI



## **MULTIPOTENTI**

**Cellule Staminali Mesenchimali**

## **OLIGOPOTENTI**

**Cellule Staminali Emopoietiche**

## **UNIPOTENTI**

**Staminali specializzate che garantiscono il ricambio di una determinata popolazione cellulare**

**OMEOSTASI  
TISSUTALE**

**Cellule vive**



**Cellule morte**

**Ricambio cellulare**

# Cellule Staminali Mesenchimali MSC

## Cellule Staminali Multipotenti

**Concetto  
di  
STAMINALITA'**



### **AUTO-RINNOVAMENTO**

Proprietà per la quale le cellule sono in grado di riprodurre se stesse

**Concetto  
di  
PLASTICITA'**



### **POTENZIALE DIFFERENZIATIVO**

Capacità di una singola cellula di dare origine a una progenie che comprende differenti tipi cellulari

**Concetto  
di  
PLASTICITA'**

**Ectoderma**

- **Epidermide**
- **Tessuto Nervoso**

**MSC**

**MULTIPOTENTI**

**Cellule  
Staminali**

**Mesenchimali**

**Mesoderma**

- **Mesoteli (che rivestono le cavità virtuali del corpo)**
- **Endoteli (che rivestono il sistema cardiovascolare)**
- **Tessuti connettivo, muscolare, osseo, cartilagineo adiposo**

**Endoderma**

**Fegato, polmone  
pancreas, tratto  
gastro-intestinale  
etc.**

# MSC

**Descritte nel 1970  
Friedenstein e coll.**

**Origine midollare**

**Derivate da un progenitore non emopoietico**

**Forma fibroblastoide**

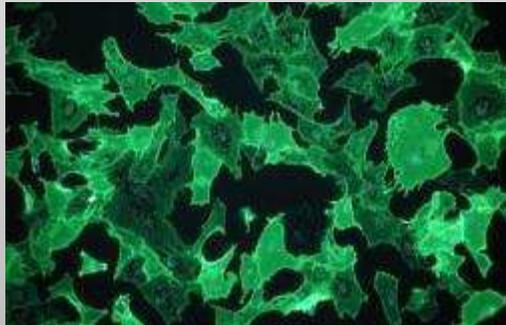
**Anni '80  
Castro-Malaspina**

**0.01-01% cellule midollari**

**Elementi cellulari in grado di produrre  
citochine stimolanti l'emopoiesi**

**Denominate CFU-F Unità formanti colonie  
fibroblastoidi**

# MSC



**Sorgenti**

- **Midollo osseo**
- **Tessuto Adiposo**
- **Sangue cordonale**
- **Placenta**
- **Gelatina di Wharton**
- **Polpa dentale (denti decidui)**

**0.01 – 0.1%**

**Midollo  
osseo**

**Sorgenti**

**Tessuto  
Adiposo**



**ISOLAMENTO MSC**  
procedure non complesse



**Immunofenotipo MSC "naive"? 0.01 – 0.1%**

**CD271**  
**CD249**  
**CD105**  
**CD49**  
**CD56**  
**CD73**

**Selezione  
positiva**

**CD45**  
**CD235**  
**(GlyA)**

**Selezione  
negativa**

# Immunofenotipo MSC

Solo dopo selezione ed  
espansione *“in vitro”*

**CD105 +**  
recettore TGF-beta  
**CD90+**  
Thy-1 thymocyte  
Differentiation Ag

**CD71 +**  
Transferrin Receptor  
protein 1  
**CD73+**  
5' -nucleotidase

**CD34 -**  
recettore CSE  
**CD45 -**  
recettore pan leucocitario

# ISCT International Society of Cell Therapy Criteri minimi di identificazione delle MSC

- Adesione alla plastica in coltura in vitro
- $\geq 95\%$  CD105+ CD90+ CD71+ CD73+
- $\leq 2\%$  CD45- CD34- HLA DR-
- Differenziazione in vitro in Osteoblasti  
Condrociti  
Adipociti

## POSITION PAPER Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement

M Dominici<sup>1</sup>, K Le Blanc<sup>2</sup>, I Mueller<sup>3</sup>, I Slaper-Cortenbach<sup>4</sup>, FC Marini<sup>5</sup>,  
DS Krause<sup>6</sup>, RJ Deans<sup>7</sup>, A Keating<sup>8</sup>, DJ Prockop<sup>9</sup> and EM Horwitz<sup>10</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cell Biology and Advanced Cancer Therapy, Oncology-Hematology Department, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy; <sup>2</sup>Center for Allogeneic Stem Cell Transplantation, Department of Laboratory Medicine, Karolinska University Hospital, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden; <sup>3</sup>University Children's Hospital, Department of Hematology and Oncology, Tuebingen, Germany; <sup>4</sup>Department of Medical Immunology, UMC Utrecht-Utrecht, the Netherlands; <sup>5</sup>Department of Blood and Marrow Transplant, UT-MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA; <sup>6</sup>Department of Laboratory Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA; <sup>7</sup>Abtey Inc., Cleveland, Ohio, USA; <sup>8</sup>Department of Medical Oncology and Hematology Princess Margaret Hospital/Ontario Cancer Institute Toronto, Ontario, Canada; <sup>9</sup>Center for Gene Therapy, Tulane University Health Sciences Center, New Orleans, Louisiana, USA and <sup>10</sup>Division of Stem Cell Transplantation and Experimental Hematology, St Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, USA

The considerable therapeutic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells (MSC) has generated markedly increasing interest in a wide variety of biomedical disciplines. However, investigators report studies of MSC using different methods of isolation and expansion, and different approaches to characterizing the cells. Thus it is increasingly difficult to compare and contrast study outcomes, which hinders progress in the field. To begin to address this issue, the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy proposes minimal criteria to define human MSC. First, MSC must be plastic-adherent when maintained in standard culture conditions. Second, MSC must express CD105,

CD73 and CD90, and lack expression of CD45, CD34, CD14 or CD11b, CD79a or CD19 and HLA-DR surface molecules. Third, MSC must differentiate to osteoblasts, adipocytes and chondroblasts in vitro. While these criteria will probably require modification as new knowledge unfolds, we believe this minimal set of standard criteria will foster a more uniform characterization of MSC and facilitate the exchange of data among investigators.

### Keywords:

MSC, stem cells, adherent cells, immunophenotype, differentiation.

Biologic and clinical interest in MSC has risen dramatically over the last two decades, as shown by the ever-increasing number of research teams studying these cells. Not only are established laboratories focusing on MSC but new investigators are rapidly being attracted to the field, which will undoubtedly accelerate scientific discovery and the development of novel cellular therapies. However, this soaring interest has also generated many ambiguities and inconsistencies in the field.

To begin to address these issues, a recent report from the International Society for Cellular Therapy (ISCT)

stated that 'multipotent mesenchymal stromal cells' (MSC) is the currently recommended designation [1] for the plastic-adherent cells isolated from BM and other tissues that have often been labeled mesenchymal stem cells [2].

The defining characteristics of MSC are inconsistent among investigators. Many laboratories have developed methods to isolate and expand MSC, which invariably have subtle, and occasionally quite significant, differences. Furthermore, investigators have isolated MSC from a variety of tissues with ostensibly similar properties [3]. These varied tissue sources and methodologies of cell

2005

ISCT  
International Society of Cell Therapy  
**Criteri di identificazione  
delle MSC**

**CD45-**

**CD105+**

**CD90+**

**CD34-**

**MSC**

**CD71+**

**HLA DR-**

**CD73+**

**Fenotipo negativo  
 $\leq 2\%$**

**Fenotipo positivo  
 $\geq 95\%$**

# MSC Caratteristiche

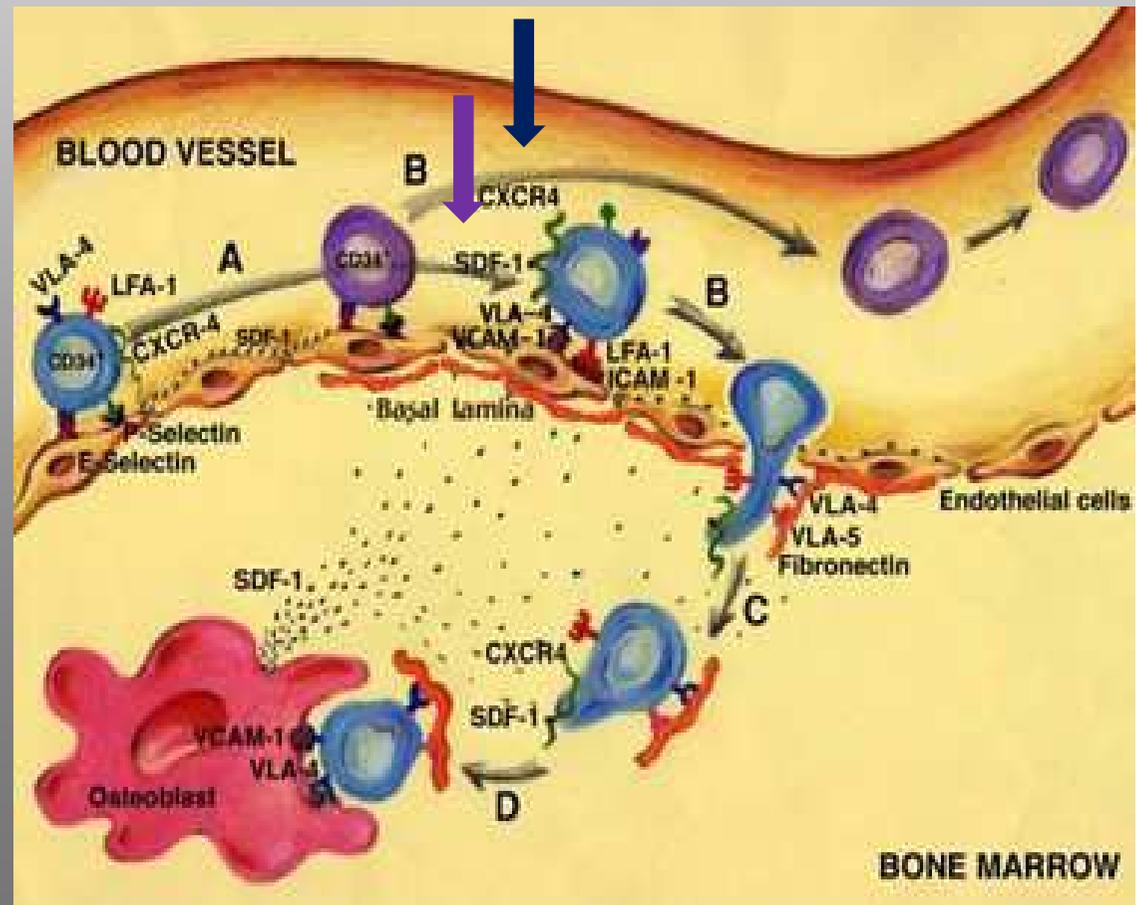
## Funzioni

Regolano il movimento delle cellule nel midollo osseo.

**Chemochine**  
Fattore di derivazione stromale **SDF-1**  
**Citochine**  
**IL-8 IL11**

La migrazione delle CSE che esprimono il recettore CXCR4 responsabile dell'attecchimento delle cellule staminali al microambiente del MO

Funzione regolatrice nella maturazione di cellule staminali emopoietiche



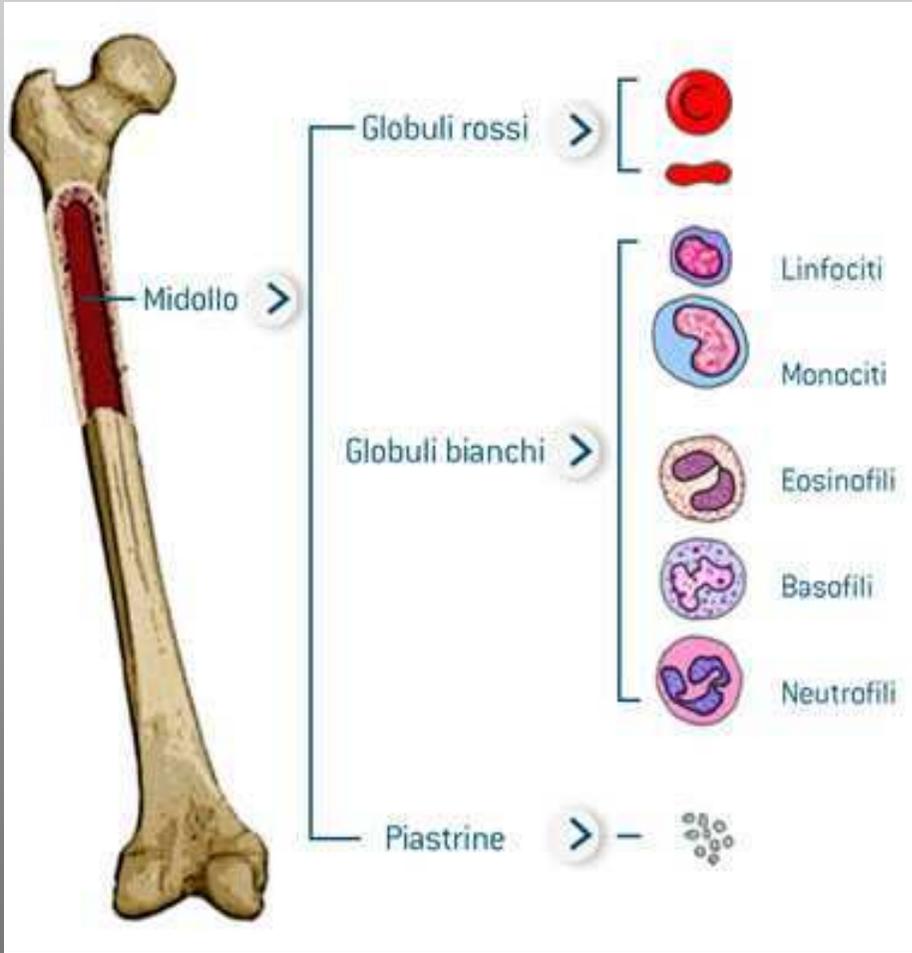
# MSC Caratteristiche

## Funzioni

Le MSC  
Stimolano l'emopoiesi

Fattori di crescita  
SCF    G-CSF  
  
Citochine  
IL-7

Funzione regolatrice nella maturazione di cellule staminali emopoietiche



# MSC e Sistema immunitario

**Funzioni**

**Attività Immunoregolatoria**



**Sintesi di citochine**

IL7

IL8

IL-10

IL-11

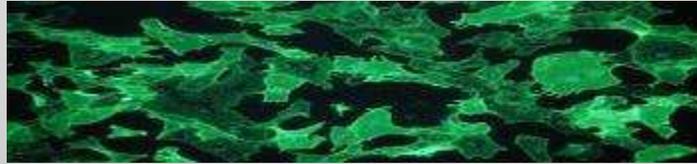
## **Inibizione**

- proliferazione dei linfociti T (Th1 e T killer) soprattutto in contesti infiammatori
- proliferazione di linfociti B e Ab sintesi
- funzione delle APC (antigen presenting cell)
- produzione di citochine

## **Attivazione**

Linfociti T reg (CD4 CD25 FoxP3)

## **Perché Coltivare ex vivo le MSC?**



**Perché qualunque sia  
la sorgente le MSC  
sono scarsamente  
rappresentate**



**0.01 – 0.1%**



**Procedure di  
arricchimento  
o di espansione**



**USO  
CLINICO**

# **Fattori che influenzano l'espansione delle Cellule Staminali Mesenchimali**

**Sorgente**



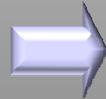
**Midollo osseo  
Tessuto Adiposo**

**Donatore**



**Età - Sesso  
Autologo o Allogenico**

**Procedure  
di arricchimento**



**Separazioni su gradiente  
Trattamenti enzimatici**

**Protocolli  
di espansione**



**Terreni di coltura  
Densità cellulare  
N° di passaggi**

**Donatore**

**MSC da midollo osseo**

**ETA'**

**Risultati contrastanti**

**59-75 anni**

**VS**

**0-18 anni**

**Capacità proliferativa  
MSC fortemente ridotta**

**Baxter et al  
2004**

**7-18 anni**

**VS**

**19-40 anni**

**VS**

**>40 anni**

**“young”**

**“adult”**

**“old”**

**Capacità proliferativa si riduce  
dopo la 5a settimana di coltura**

**Stoizing et al  
2008**

**Donatore**

# MSC da tessuto adiposo

**SESSO**

Faustini et al  
2010

**M**

**VS**

**F**

**> resa MSC**

**Recettori  
estrogeni**

**Funzione stimolante la  
proliferazione mediante il controllo  
di fattori di crescita e un'azione sul  
ciclo di divisione cellulare**

**MSC**

**Funzione inibitrice  
della proliferazione**

**Recettori  
androgeni**

**Donatore**

**Sorgente  
autologa**



**Sorgente  
allogena**

**Contesto clinico**

**Patologia  
Trattamento terapeutico**

**Sorgente allogenica**



**MSC e HLA**

**Scarsa  
espressione degli  
antigeni di  
istocompatibilità di  
classe I**



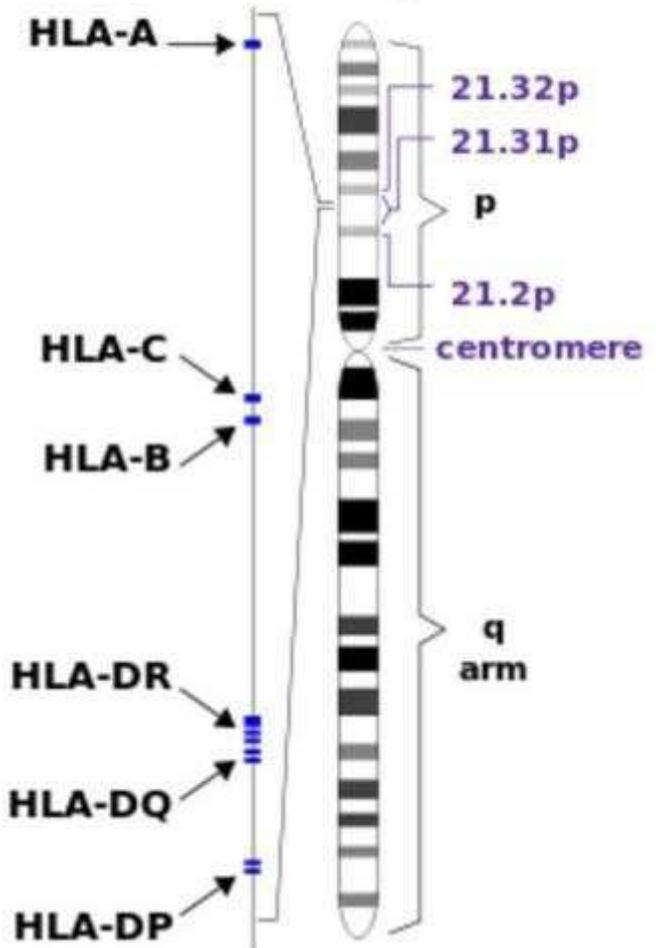
**Scarsa immunogenicità  
delle MSC**

**Non esprimono gli  
antigeni di  
istocompatibilità di  
classe II**



**DR -**

## HLA MHC Complex



human chromosome 6

# MSC e TRAPIANTO di CSE

**CSE**

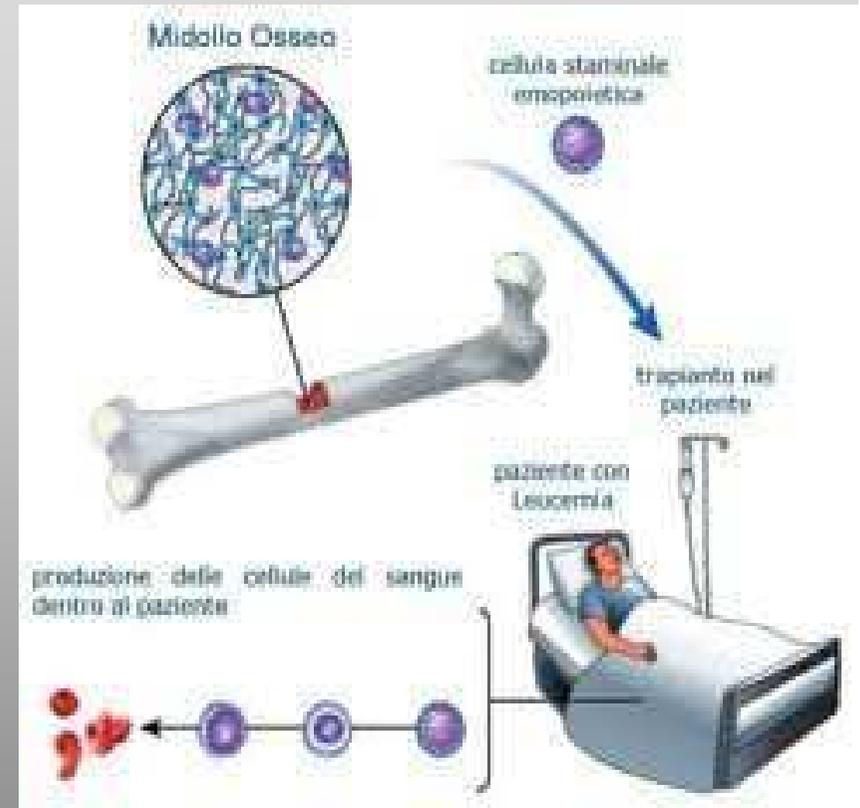
autologhe  
allogeniche



**MSC**

espande di  
terza parte

**Studi pilota hanno mostrato che la infusione di MSC di terza parte in associazione al trapianto di CSE autologhe e allogeniche induceva un' accelerazione del recupero emopoietico con riduzione del mancato attecchimento e dell' incidenza di GVHD**



Cotransplantation of Mesenchymal Stem Cells might prevent death from GVHD without abrogating GvL after HLA mismatched allogeneic transplantation following nonmyeloablative conditioning

Baron et al. Biol Blood Marrow Transplant. 2010, 16, 838-847



Terapia della  
**GVHD** steroide  
resistente mediante  
infusione di **MSC**

## **MSC**

**Attività Immunoregolatrice**

**Inibizione**

proliferazione dei linfociti T (Th1 e T killer)  
soprattutto in contesti infiammatori

**Attivazione**

Linfociti T reg (CD4 CD25 FoxP3)

1° caso di GVHD severa resistente agli steroidi trattata con  
successo mediante infusione di MSC risale al 2004  
in un paziente pediatrico di 9 anni affetto da LLA (Le Blanc)

# MSC e GVHD

- 2006, Ringden et al. - 8 pazienti
- 2007, Fang et al. - 6 pazienti
- 2008, Le Blanc et al. - 55 pazienti di cui 25 pediatrici  
studio multicentrico non randomizzato
- 2008, Muller et al. - 5 pazienti
- 2009, Kebriae et al. - 32 pazienti
- 2009, Kurtzberg et al. - 59 pazienti pediatrici
- 2009, von Bonin et al. - 13 pazienti
- 2010, Martin et al. - 244 pazienti studio multicentrico randomizzato
- 2010, Zhou et al. - 4 pazienti cGVHD
- 2010, Lucchini et al. - 11 pazienti pediatrici
- 2010, Weng et al - 19 pazienti → Median follow-up 697 g, 4 CR, 10 PR

## **RISULTATI**

## **MSC e GVHD**

- **Fattibilità e sicurezza del trattamento**
- **Assenza o lievi effetti collaterali immediati e/o ritardati dopo infusione di MSC**
- **I pazienti che rispondevano al trattamento con MSC hanno potuto sospendere gli immunosoppressori**
- **Risposta completa o parziale nella maggior parte dei pazienti soprattutto se pediatrici**
- **Risposta maggiore nella GVHD acuta rispetto alla cronica**

## **Follow up a distanza**

**Rischi di ricomparsa nel tempo della sintomatologia da GVHD**

# Procedure di arricchimento

**Midollo  
Osseo**

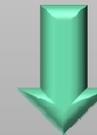
**FILTRAZIONE**



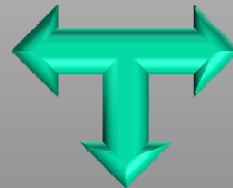
**GRADIENTE  
di DENSITA'**

**Tessuto  
Adiposo**

**LAVAGGI**



**DIGESTIONE  
ENZIMATICA**



**LAVAGGI**

**CONTA**

**COLTURA ex vivo**

# Protocolli di espansione

**SELEZIONE**

**ADERENZA alla PLASTICA**

**CONFLUENZA**

**DISTACCO mediante TRIPSINA**

1°

Passaggio

P1

**CONTA al citofluorimetro con  
Mo-Ab specifici**

**ESPANSIONE**

**Semina a DENSITA' CELLULARE idonea**

**CONFLUENZA**

**Valutazione dell' indice di  
PROLIFERAZIONE**

2°

Passaggio

P2

P3

**DIFFERENZIAZIONE**

## Protocolli di espansione

## TERRENI di COLTURA

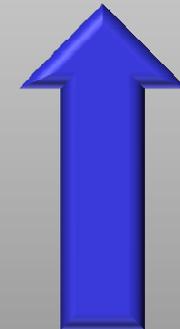
Addizionato con  
**SIERO ANIMALE**

GMP grade?



**D-MEM**

Minimum  
Essential  
Medium



Le piastrine per la loro fisiologica funzione di riparazione dei tessuti sono una fonte ricca di numerosi fattori di crescita

PDGF (platelet-derived growth factor)  
 $\beta$ -FGF (basic-fibroblast growth factor)  
VEGF (vascular endothelial growth factor)  
TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ )



**IL LISATO  
PIASTRINICO**