ONCOLOGIA OGGI
Animali e Uomo Alleati Contro i Tumori

Venerdì 12 giugno 2009 ore 08.30 – 14.00

COMUNE DI ROMA
Palazzo Senatorio- Aula Giulio Cesare
P.zza del Campidoglio - Roma

CELLULE STAMINALI TUMORALI

Tullio Florio
Sezione di Farmacologia, Dipartimento di Oncologia, Biologia e Genetica
Università di Genova

Nonostante i recenti progressi nella diagnosi e nella terapia dei tumori, che hanno sensibilmente migliorato la prognosi di molti istotipi tumorali, la mortalità complessiva è ancora elevata e in molti casi non esiste ancora una terapia nemmeno parzialmente efficace.

E' stato proposto che lo sviluppo di tumori, la loro radio- e chemio-resistenza e lo sviluppo di metastasi, sia in gran parte dipendente dalla presenza nella massa neoplastica di sottopopolazioni di "cellule staminali tumorali" (CST) che per le loro proprietà di indurre lo sviluppo di tumori sono anche state definite "tumor initiating cells".

L'identificazione e lo studio delle caratteristiche biologiche e di sensibilità ai farmaci delle CST rappresenta quindi una delle aree più innovative e rilevanti della ricerca oncologica. Le CST sono state identificate inizialmente nelle leucemie ed, in seguito, in numerosi tumori solidi (gh. mammaria, SNC, colon, prostata, polmone, ecc.), e sono oggi ritenute il vero bersaglio della terapia antineoplastica in grado di inibire la crescita tumorale, le recidive e la diffusione metastatica.

La definizione di CST deriva dal confronto di queste cellule neoplastiche con le cellule staminali normali. Infatti le cellule staminali normali rappresentano, nell'adulto, gli elementi cellulari di riserva dei tessuti che, grazie alle loro capacità di autorinnovamento e migrazione, si attivano per garantire il fisiologico rinnovamento cellulare o il processo di riparazione di lesioni al tessuto stesso.

Nelle neoplasie invece, le CST iniziano e sostengono lo sviluppo dei tumori, grazie alla capacità di autorinnovamento, e la loro capacità di migrare a distanza è ritenuta responsabile della diffusione metastatica. Le CST, infatti, pur costituendo un'esigua sottopopolazione nella massa tumorale (1-2% delle cellule) hanno caratteristiche peculiari che ne permettono la diffusione e sopravvivenza all'interno dell'organismo umano.

Esse si sostentano e si rinnovano in modo autonomo, sono multipotenti, ovvero sono in grado di generare tutte le cellule differenziate presenti nel tessuto di origine, possiedono ridotta attività proliferativa, capacità di escludere agenti tossici esterni e sono protette dai processi di morte programmata (apoptosi). Per la loro esiguità numerica e le proprietà biologiche peculiari le CST sono difficili da isolare ed analizzare.

Negli ultimi anni però, partendo dagli studi sulle staminali normali, è stato possibile isolare da tumori primari e coltivare in laboratorio le CST, e quindi analizzarne le caratteristiche biologiche e molecolari e, soprattutto, la sensibilità agli approcci terapeutici di uso corrente. Infatti gli attuali farmaci antineoplastici hanno come bersaglio la massa delle cellule tumorali altamente proliferanti, le quali, generate a partire dalle CST, contribuiscono

allo sviluppo della massa tumorale per un periodo temporalmente limitato. Dopo qualche divisione cellulare queste cellule si esauriscono e non sono in grado di rigenerare il tumore.

La progressione tumorale dipenderà quindi dalla produzione di altre cellule proliferanti a partire dalle CST, che rappresentano quindi il vero serbatoio di cellule tumorali responsabile della crescita neoplastica. Le CST, avendo un'attività proliferativa ridotta, risultano però poco sensibili alle terapie convenzionali e grazie a meccanismi di autorinnovamento permangono nel tumore stesso e determinano recidive anche quando la gran parte della massa tumorale è rimossa.

Inoltre per la loro natura "staminale" queste cellule hanno sviluppato meccanismi di difesa nei confronti dei comuni approcci citotossici (pompe di efflusso di farmaci, meccanismi di riparazione del DNA) che le rendono difficili da eliminare. E' quindi essenziale comprendere i meccanismi intracellulari attraverso cui le CST resistono a chemio- e radioterapia, per identificare nuovi approcci terapeutici in grado di eliminare completamente queste cellule.

La scoperta delle CST ha dato nuovo impulso anche allo studio dei processi metastatici mediante i quali le cellule tumorali migrano per colonizzare organi distanti, fornendo informazioni sui meccanismi alla base della disseminazione tumorale e l'individuazione di bersagli terapeutici per farmaci più specifici ed efficaci. L'identificazione, la purificazione e lo studio delle proprietà biologiche delle CST rivestono quindi un'importanza fondamentale nello studio delle neoplasie e, in prospettiva, possono fornire nuovi modelli per la prevenzione, la diagnosi e la terapia dei tumori.

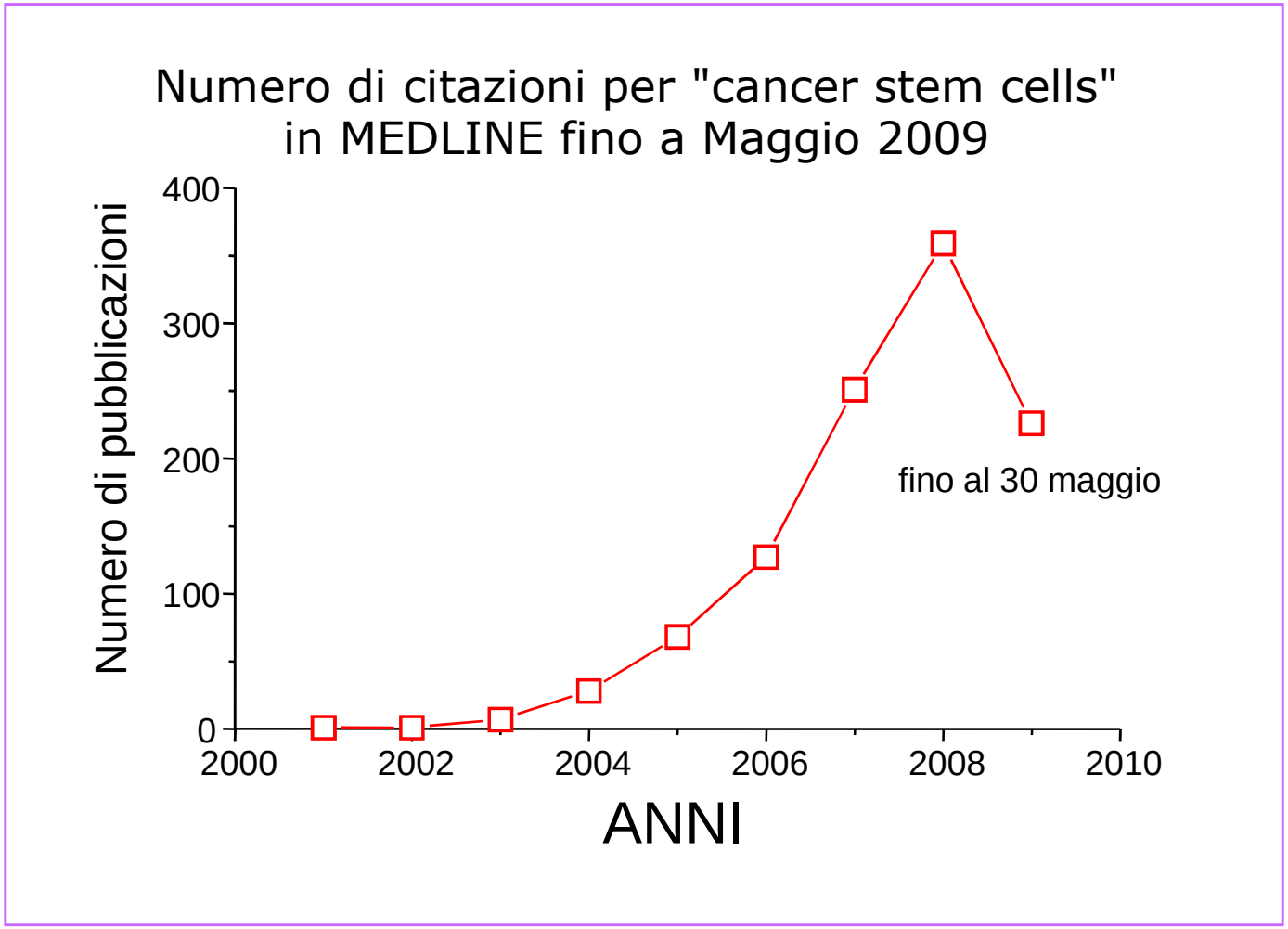
Nella relazione saranno discussi, oltre ai principi generali della tumorigenesi alla luce della teoria delle cellule staminali tumorali, anche dati recenti su CST di glioblastoma umano in cui si evidenzia come dallo studio di questa popolazione cellulare sia possibile identificare determinanti molecolari della risposta individuale dei tumori alla terapia e il contributo che può essere fornito dall'Oncologia Comparata a questi studi.

In conclusione, lo sviluppo futuro della ricerca sulle cellule staminali tumorali prevede tre principali obiettivi: la stabilizzazione delle colture in vitro delle cellule staminali derivate da diversi tipi tumorali; la definizione del fenotipo delle cellule staminali tumorali per valutare la predittività prognostica e di risposta terapeutica della loro identificazione; la caratterizzazione di modelli sperimentali per definirne la sensibilità a trattamenti farmacologici mirati.

CELLULE STAMINALI TUMORALI:
basi teoriche ed implicazioni terapeutiche

Tullio Florio
Professore di Farmacologia
Dip. Oncologia, Biologia e Genetica
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Università di Genova

Il numero di pubblicazioni su "CANCER STEM CELLS" è aumentato in maniera esponenziale negli ultimi anni

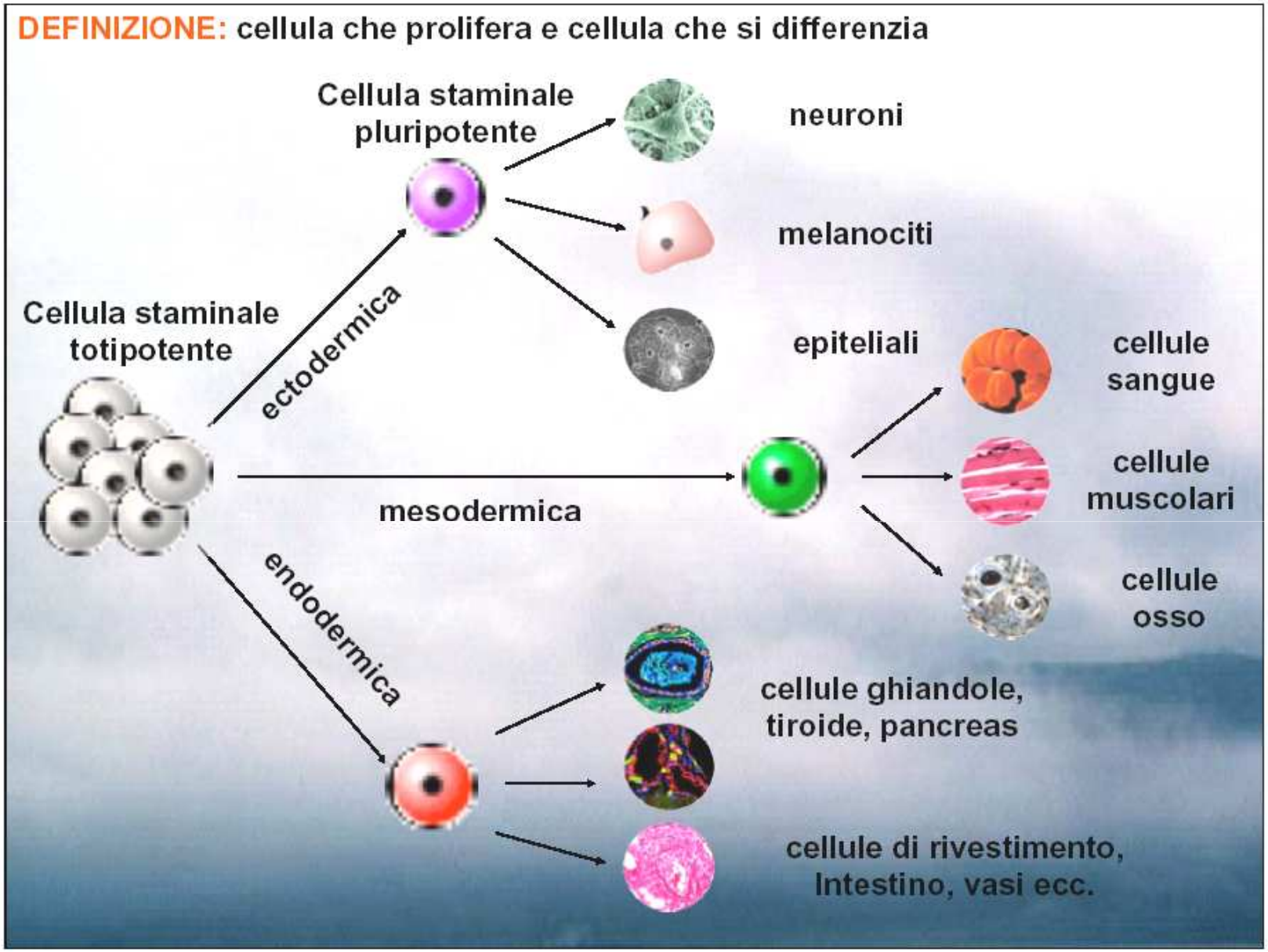


Cellule staminali normali

Rara popolazione cellulare presente in ciascun organo in grado di "autorinnovarsi" e dare origine a tutti i diversi tipi cellulari di un dato organo dirigendo il processo di organogenesi

Cellule staminali tumorali

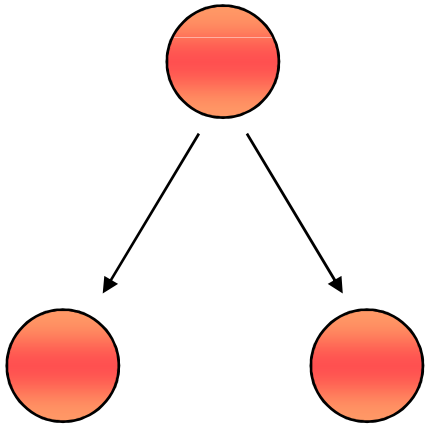
Rara popolazione cellulare in grado di "autorinnovarsi" e dare origine a cellule tumorali fenotipicamente diverse dirigendo il processo di tumorigenesi (n.b. definizione funzionale)


DEFINIZIONE: cellula che prolifera e cellula che si differenzia
Cellula staminale pluripotente
neuroni
melanociti
epiteliali
Cellula staminale totipotente
ectodermica
mesodermica
endodermica
cellule sangue
cellule muscolari
cellule osso
cellule ghiandole, tiroide, pancreas
cellule di rivestimento, Intestino, vasi ecc.

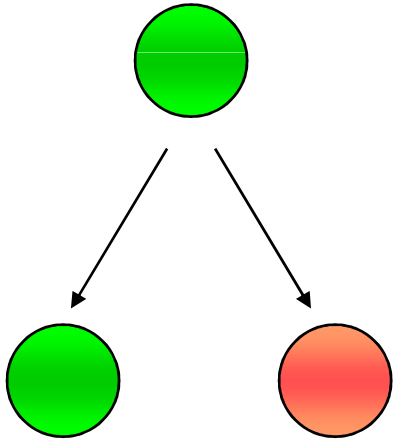
Regole alla base della crescita dei tessuti normali

Le cellule Non-staminali si dividono simmetricamente

Le cellule Staminali si dividono asimmetricamente

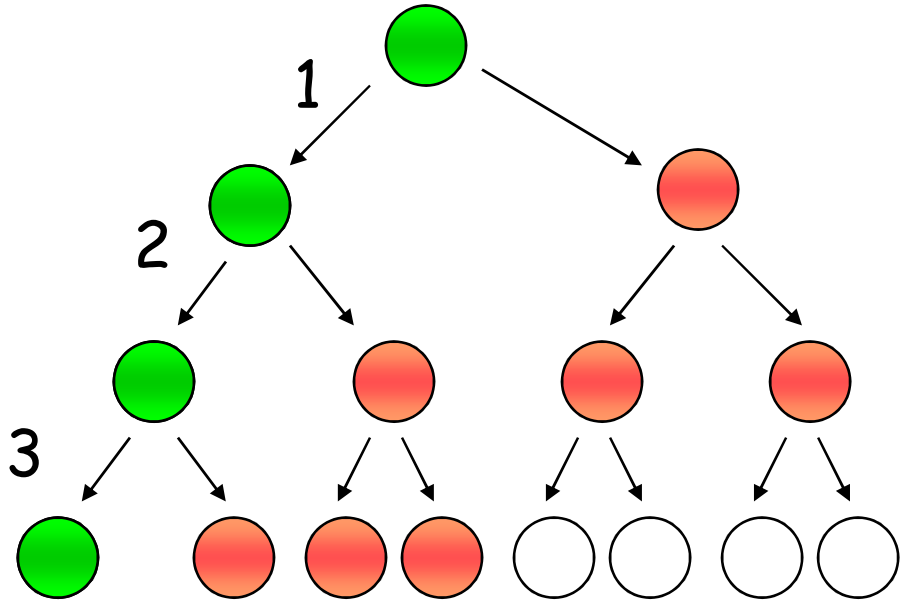


Divisione cellulare simmetrica



Divisione cellulare asimmetrica

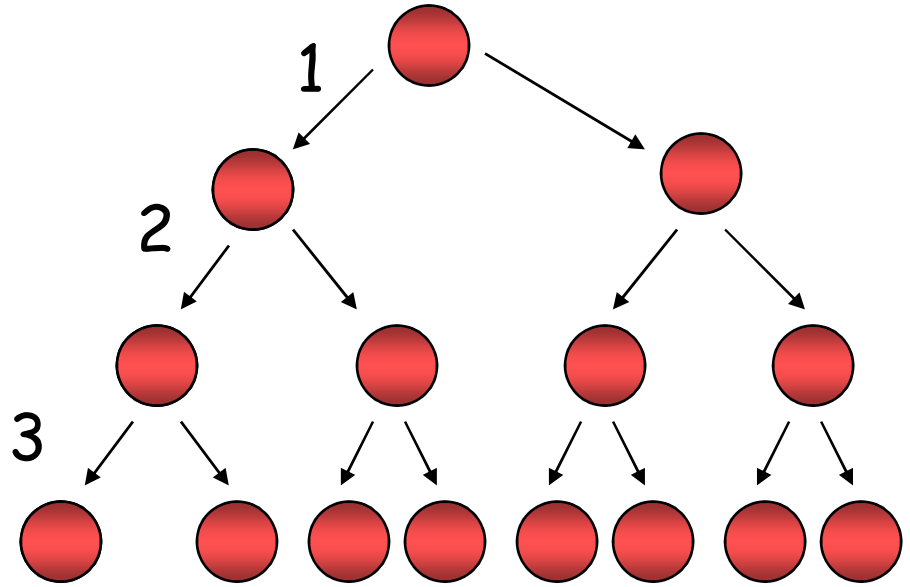
Regole alla base della crescita dei tessuti normali



Le cellule staminali mediante i meccanismi di "self renewal" (autorinnovamento) hanno *potenzialità* di sopravvivenza illimitata

Le cellule non-staminali hanno una durata di vita limitata

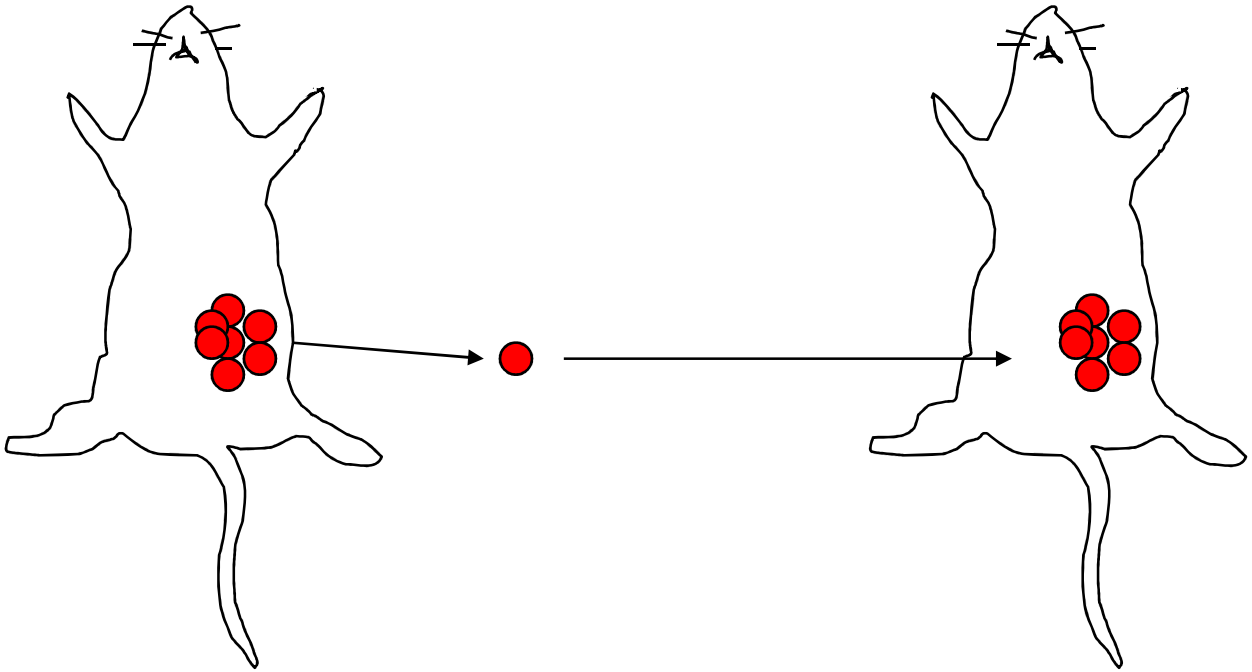
Visione tradizionale della crescita tumorale



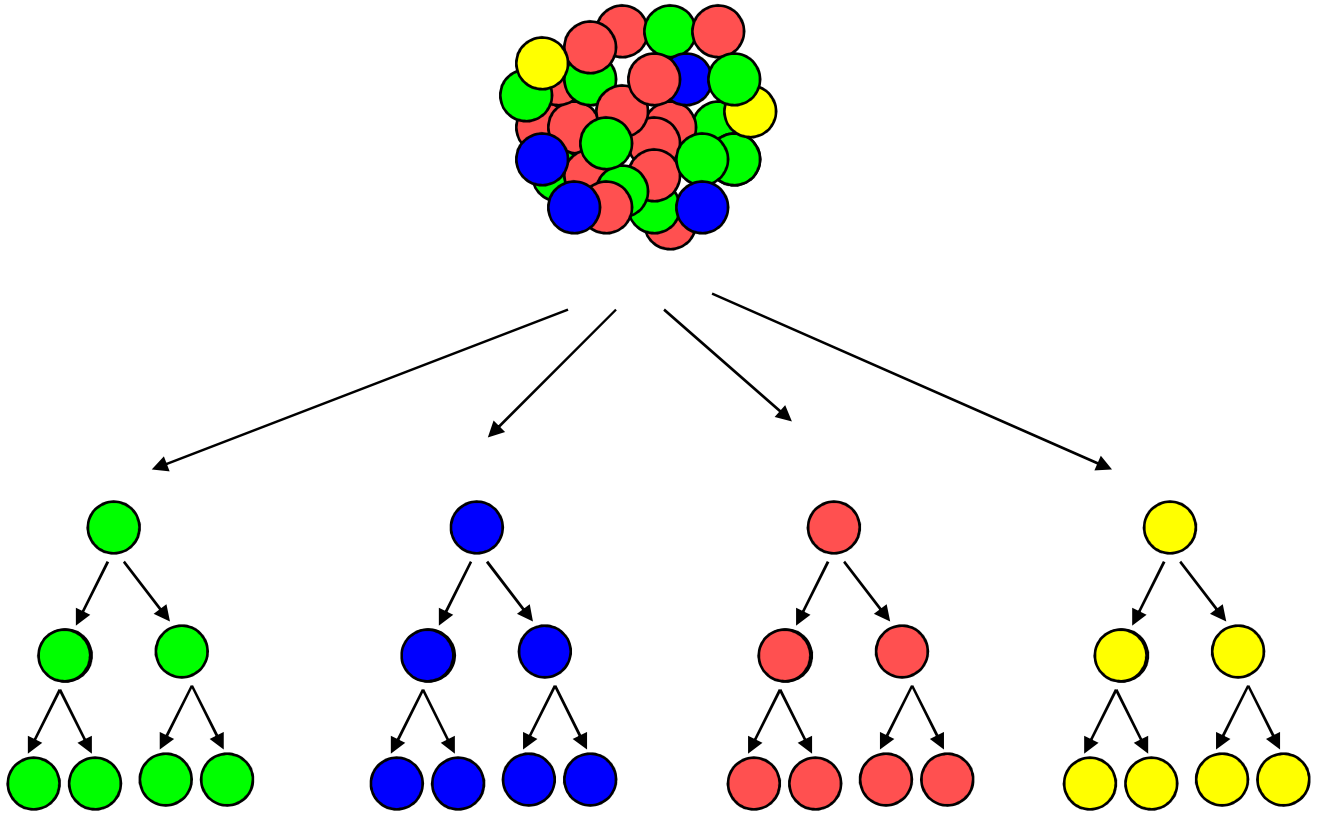
Regole:

1) I tumori sono clonali = originano dalla trasformazione di una singola cellula
2) Tutte le cellule tumorali hanno un ciclo vitale infinito
3) Tutte le cellule tumorali si dividono in maniera simmetrica

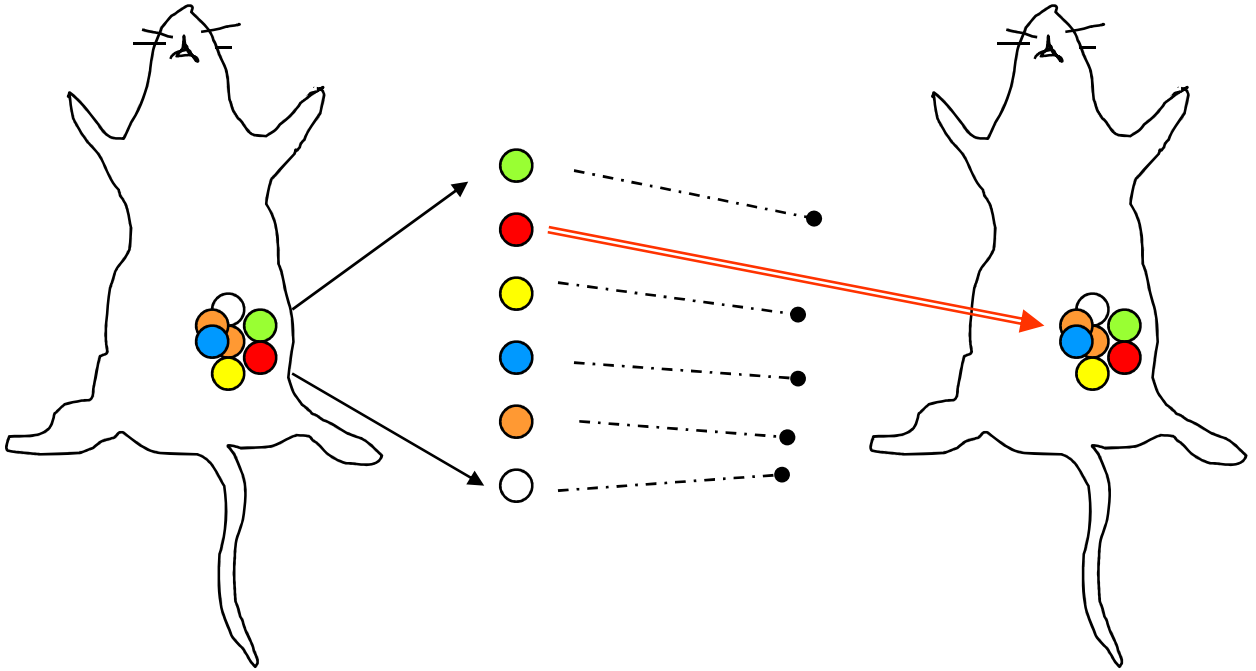
Modello di tumorigenesi tradizionale (non-tumor stem cell model): ogni cellula tumorale ha potenziale tumorigenico



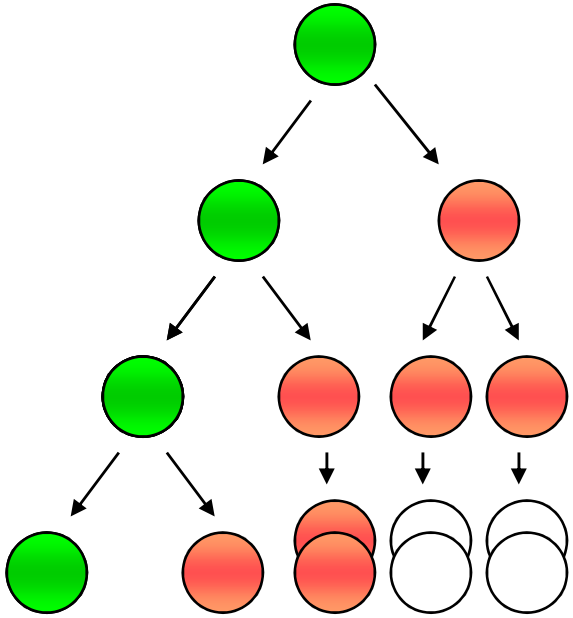
Predizione della tumorigenicità nel modello clonale dei tumori rispetto all'eterogeneità cellulare



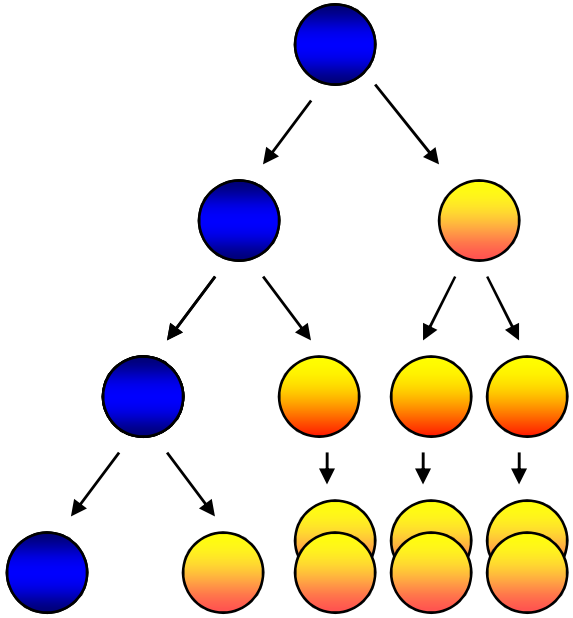
In realtà è stato dimostrato che solo una piccola sottopopolazione di cellule tumorali ha proprietà tumorigeniche: le cellule staminali tumorali



La crescita tumorale segue regole simili al normale sviluppo dei tessuti



Tessuti Normali



Tumori

Adult stem cell = undifferentiated

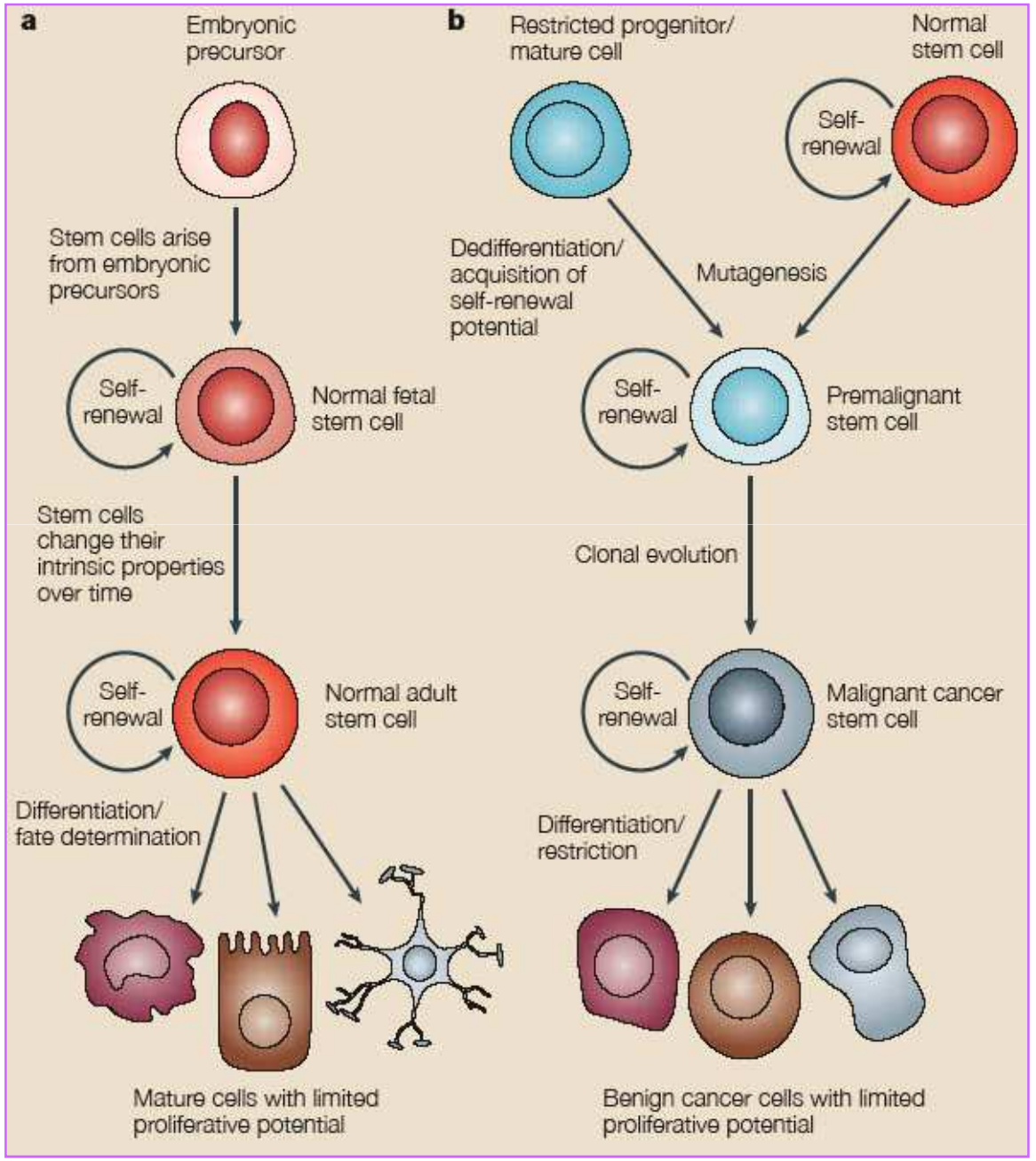
Transient amplifying cell

Normal differentiated cell

Tumor stem cell = tumorigenic

Non-tumorigenic tumor cell

Cellule staminali normali ⟺ Cellule staminali tumorali



Cancer Stem Cells umane: leucemie, carcinomi mammari e tumori cerebrali

Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells

Muhammad Al-Hajj*, Max S. Wicha*, Adalberto Benito-Hernandez†, Sean J. Morrison*‡§, and Michael F. Clarke*‡¶

PNAS | April 1, 2003 | vol. 100 | no. 7 | 3983–3988

Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors

Sheila K. Singh, Ian D. Clarke, Mizuhiko Terasaki, Victoria E. Bonn, Cynthia Hawkins, Peter B. Dirks

[CANCER RESEARCH 63, 5821–5828, September 15, 2003]

Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors

Antonio Cozzio,[1,2] Emmanuelle Passegué,[1] Paul M. Ayton,[1] Holger Karsunky, Michael L. Cleary, and Irving L. Weissman[3]

GENES & DEVELOPMENT 17:3029–3035 © 2003

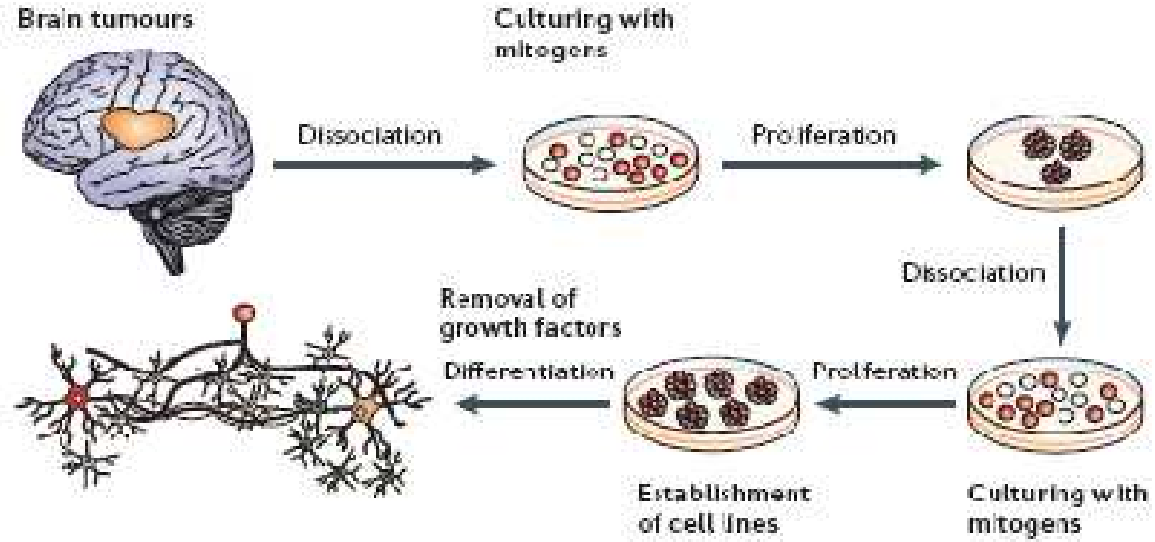
Cancer stem cells have been identified in:

myeloma, melanoma prostate, pancreas, colon and lung cancers,

.....

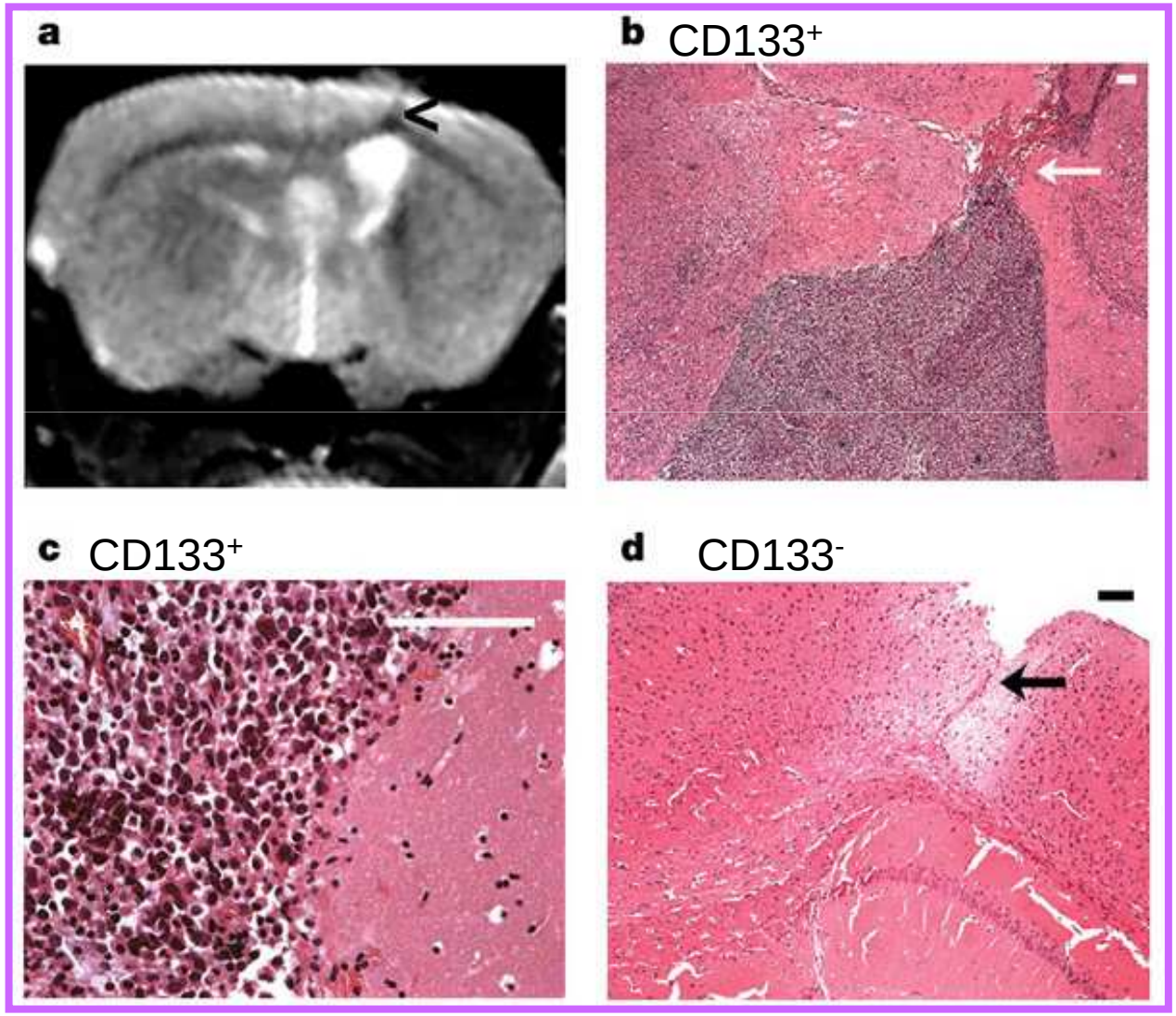
PREPARAZIONE DI CELLULE STAMINALI DA GLIOBLASTOMA

Le cellule staminali tumorali possono essere coltivate in vitro in mezzi arricchiti con **fattori di crescita** dando origine ad aggregati sferoidi arricchiti in cellule a potenziale staminale (neurosfere, mammosfere)



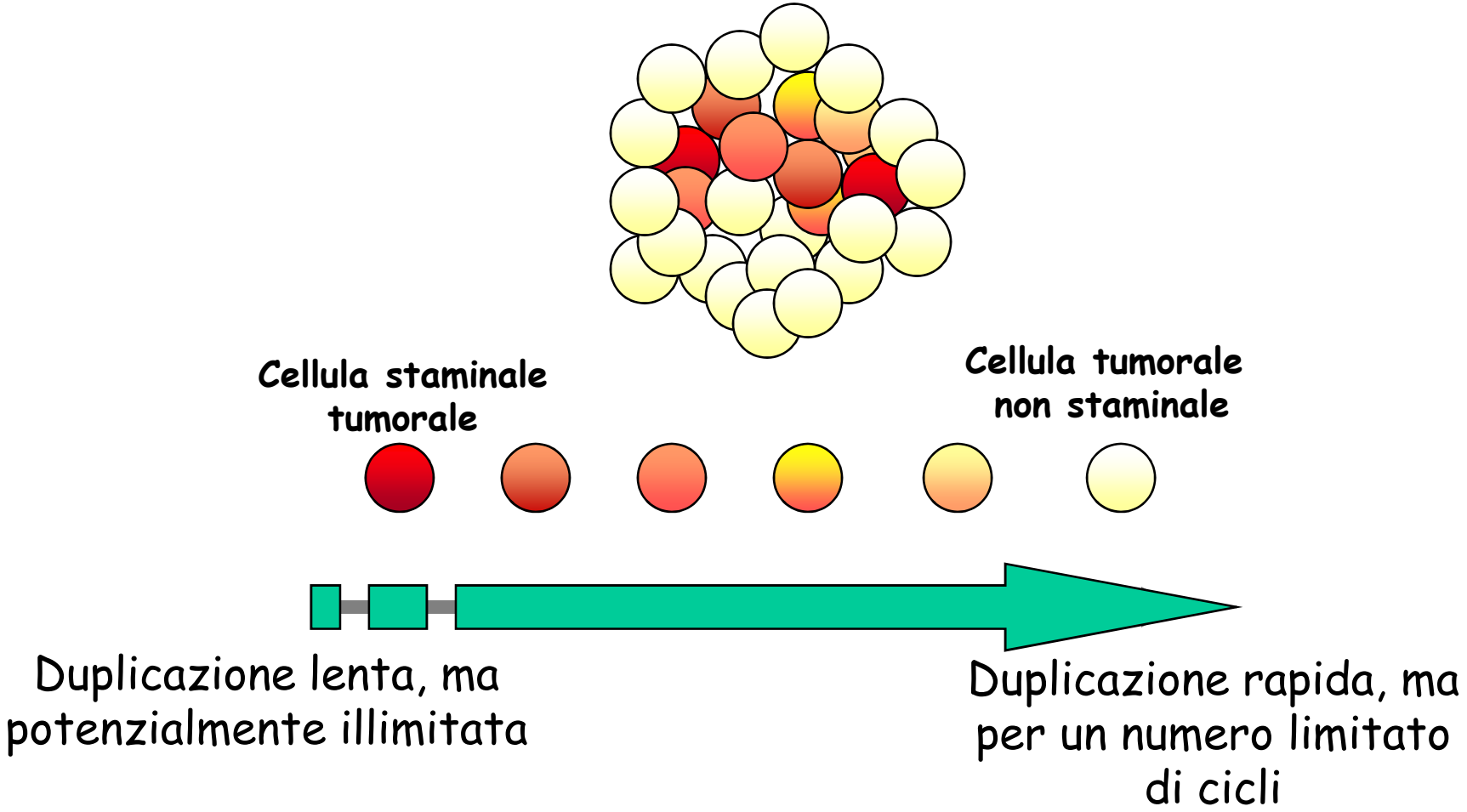


Le cellule staminali dei tumori cerebrali sono state dimostrate mediante iniezione intracranica di cellule CD133$^+$ in topi NOD/SCID

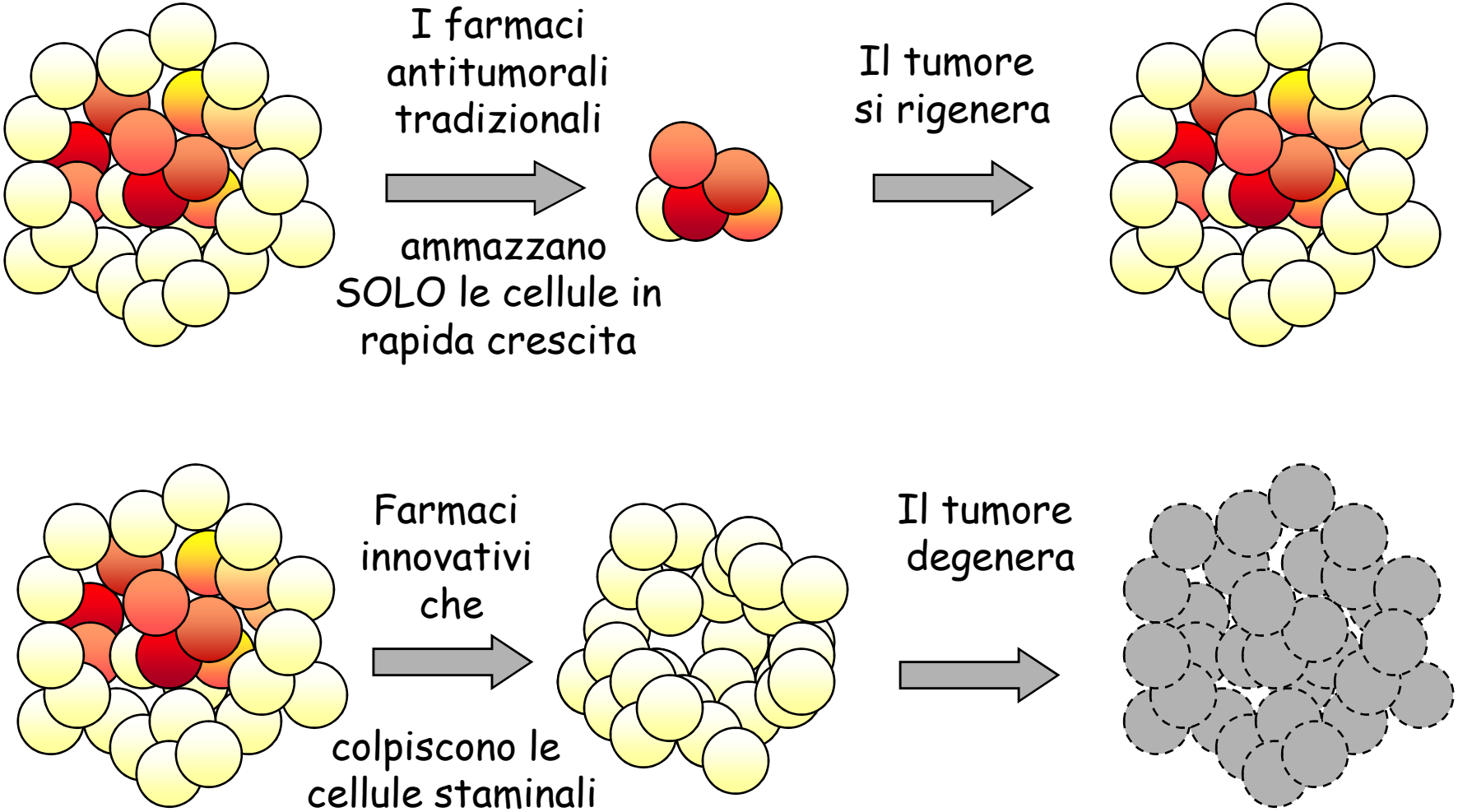


Singh et al. 2004 Nature 432: 396-401

Implicazioni terapeutiche del modello delle cellule staminali tumorali



Implicazioni terapeutiche del modello delle cellule staminali tumorali



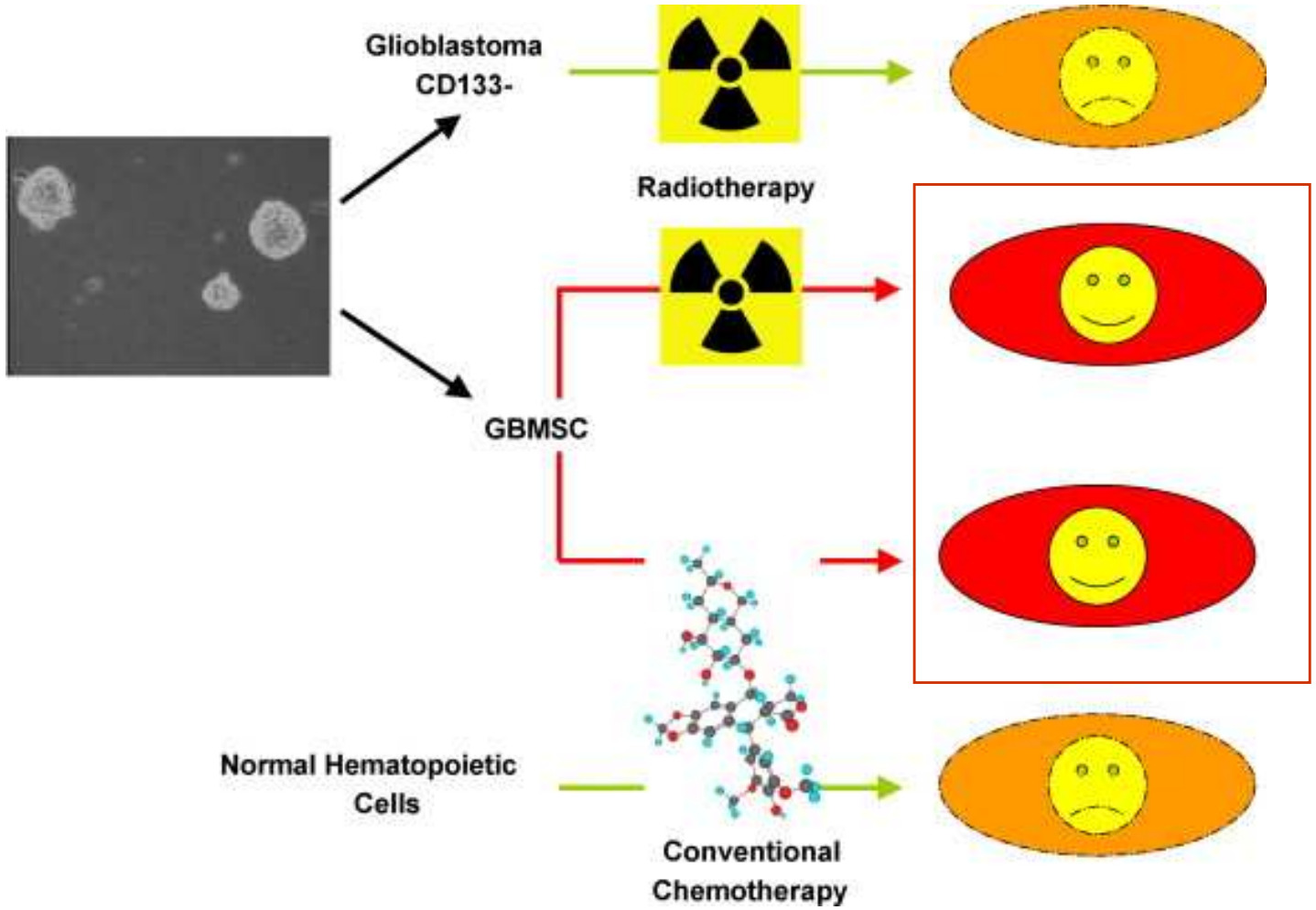
CARATTERISTICHE DELLE CELLULE STAMINALI TUMORALI

✓ Ridotta velocità di duplicazione cellulare ma persistente in maniera *potenzialmente* illimitata

✓ Self-renewal e divisione asimmetrica

✓ Capacità differenziativa in cellule tumorali ad alta velocità di duplicazione ma per pochi cicli

✓ Elevata resistenza ai farmaci (per aumentata efficienza dei meccanismi di riparazione del DNA e per aumento dell'espressione e dell'attività delle pompe di efflusso per i farmaci)



"Glioblastoma stem cells (GBMSCs) are resistant to chemo-radiotherapy. Radiotherapy can effectively kill CD133 negative cells, while sparing GBMSCs, which are resistant to both conventional chemotherapy and radiotherapy. In contrast, normal haematopoietic cells are a sensitive target of conventional cancer therapy, whose major side effect is the depletion of myeloid cells in the bone marrow."

Iannolo G. Critical Rev. in Oncology 66:42, 2008

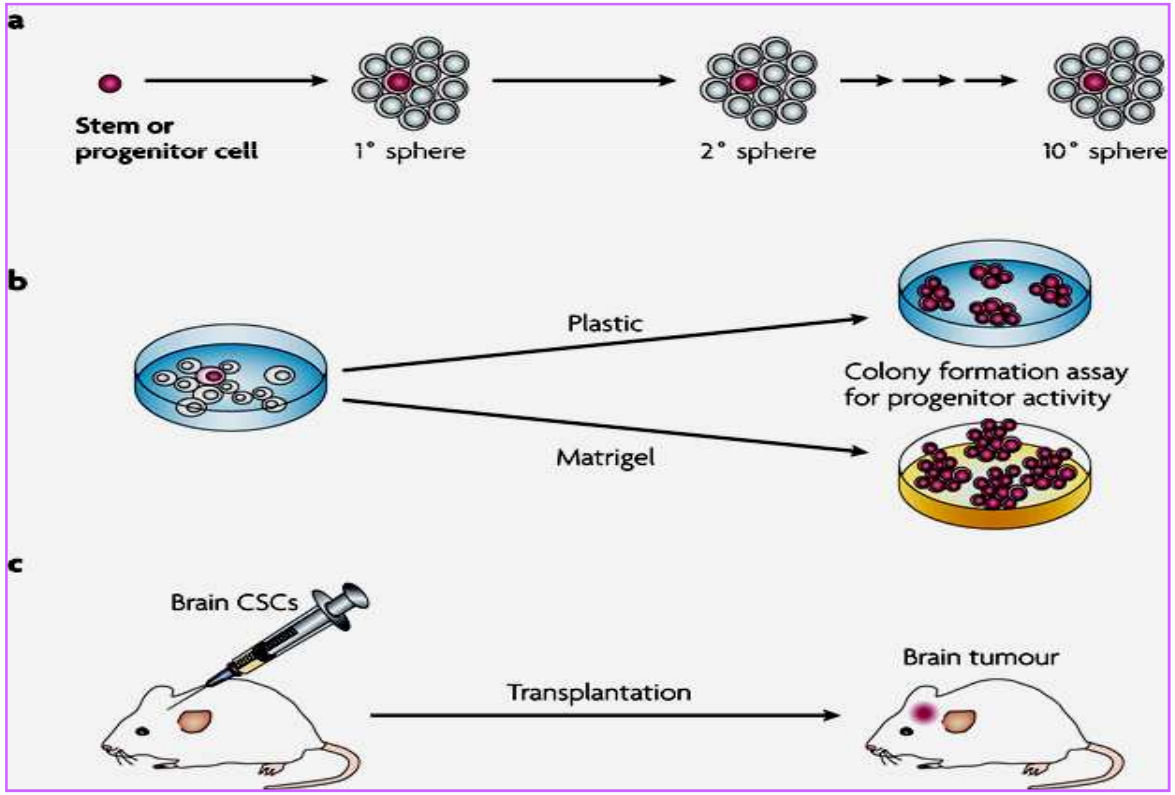
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 284, NO. 11, pp. 7138–7148, March 13, 2009

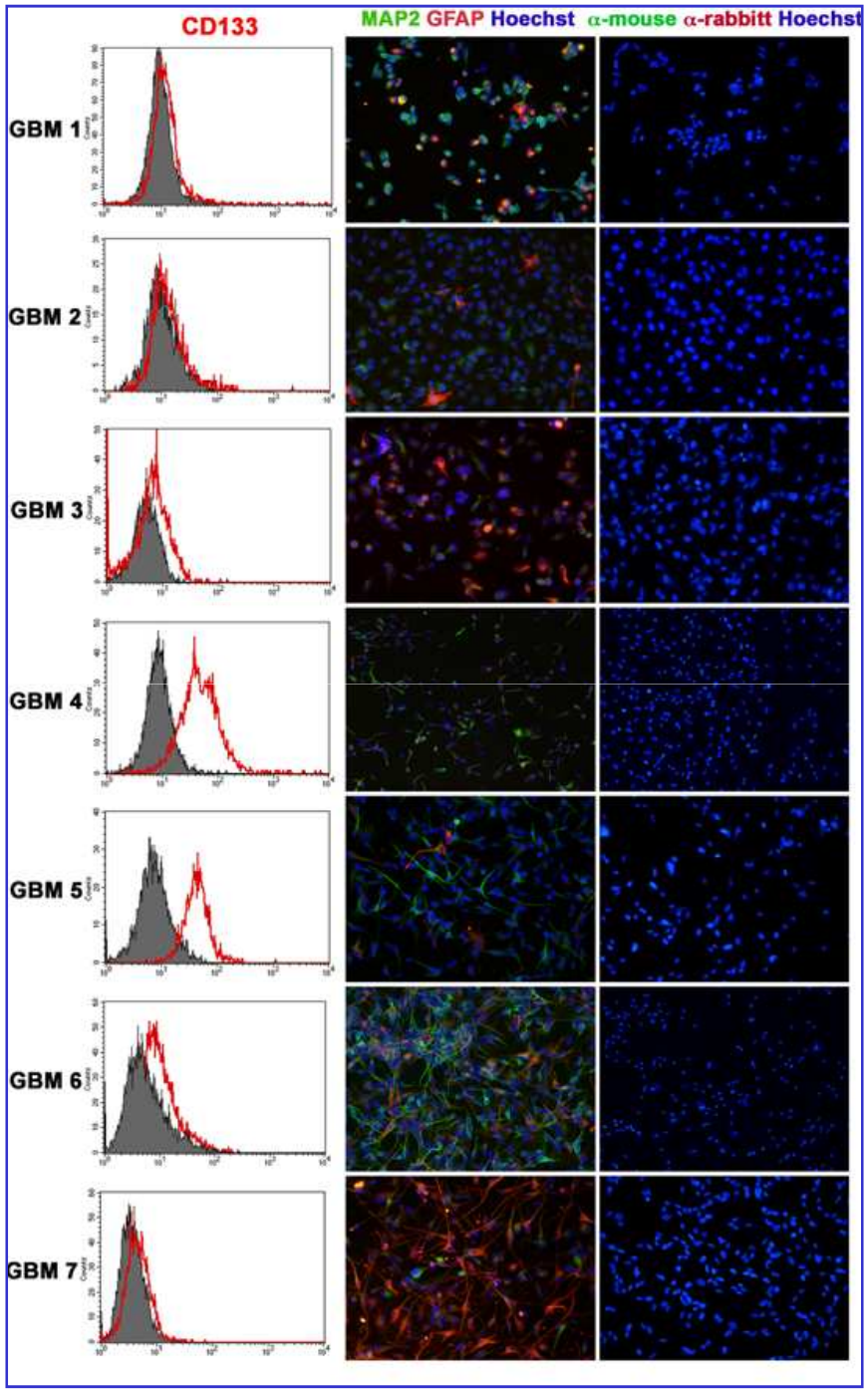
Different Response of Human Glioma Tumor-initiating Cells to Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Inhibitors*[S]

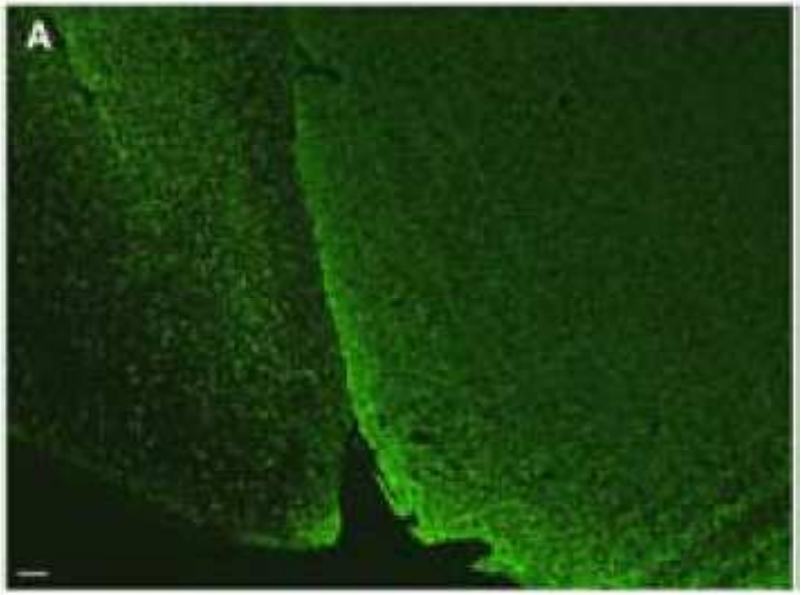
Received for publication, September 15, 2008, and in revised form, January 14, 2009 Published, JBC Papers in Press, January 14, 2009, DOI 10.1074/jbc.M807111200

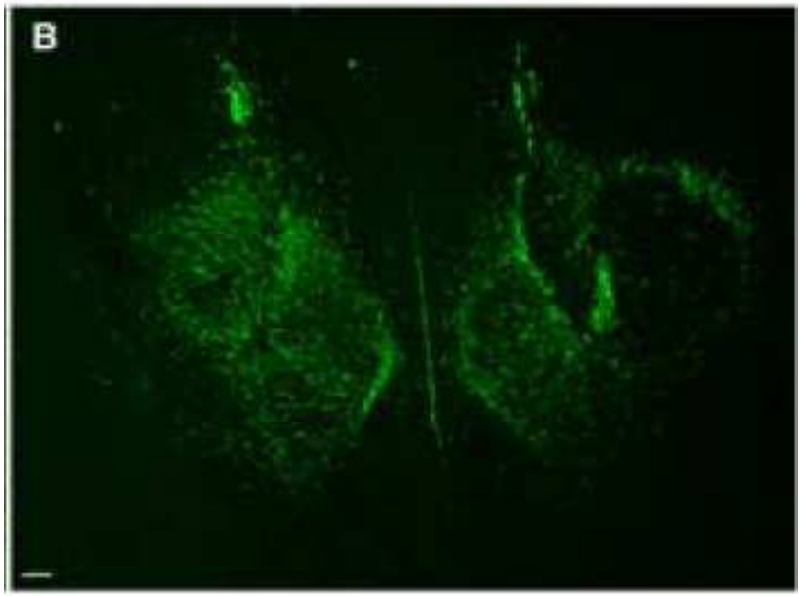
Fabrizio Griffero[‡§], Antonio Daga[‡], Daniela Marubbi[§], Maria Cristina Capra[‡], Alice Melotti[‡§], Alessandra Pattarozzi[§], Monica Gatti[§], Adriana Bajetto[§], Carola Porcile[§], Federica Barbieri[§], Roberto E. Favoni[‡], Michele Lo Casto[‡], Gianluigi Zona[¶], Renato Spaziante[¶], Tullio Florio[§1,2], and Giorgio Corte[‡§1,3]

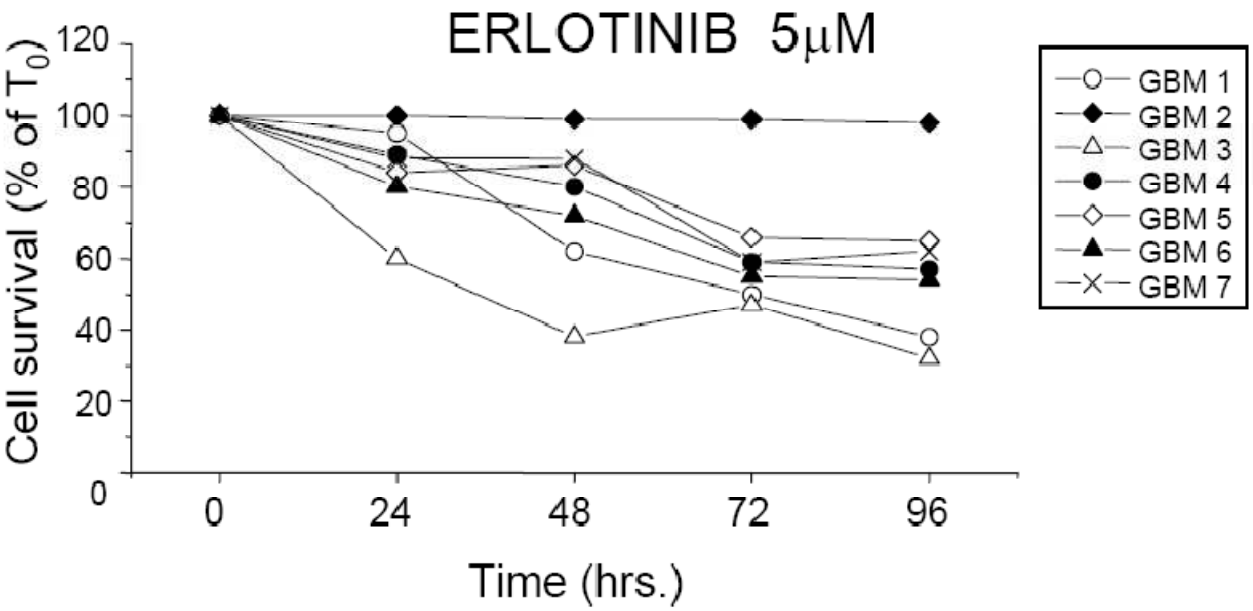
From the [‡]Department of Translational Oncology, National Institute for Cancer Research, 16132 Genova and [§]Department of Oncology, Biology and Genetics and [¶]Department of Neuroscience, Ophthalmology and Genetics, University of Genova, 16132 Genova, Italy

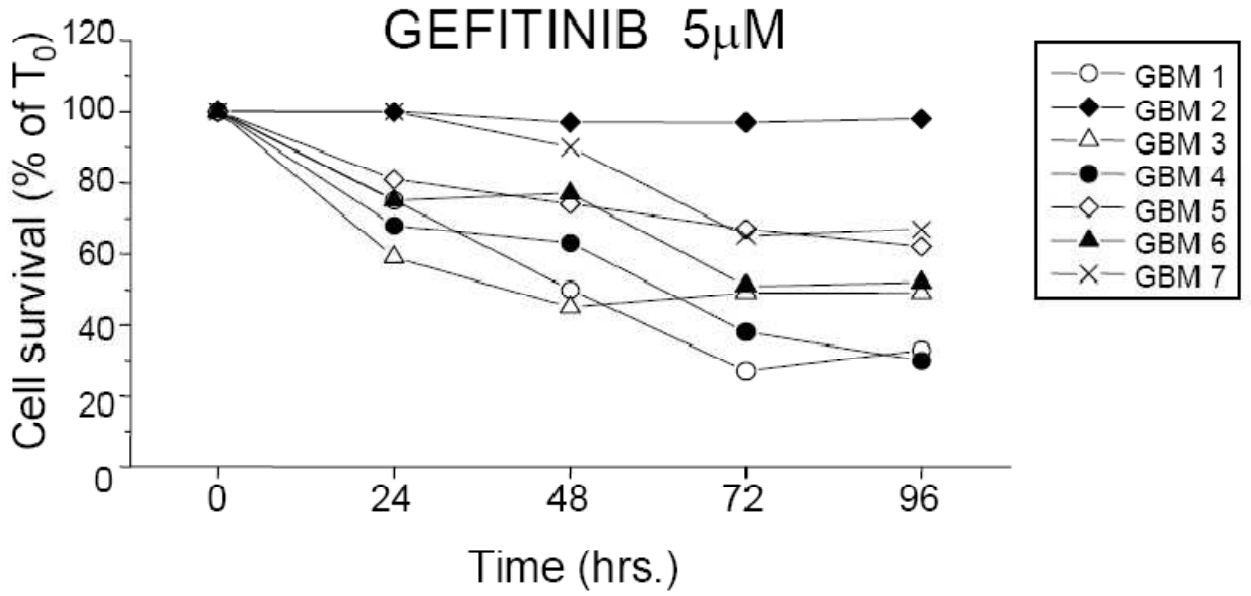


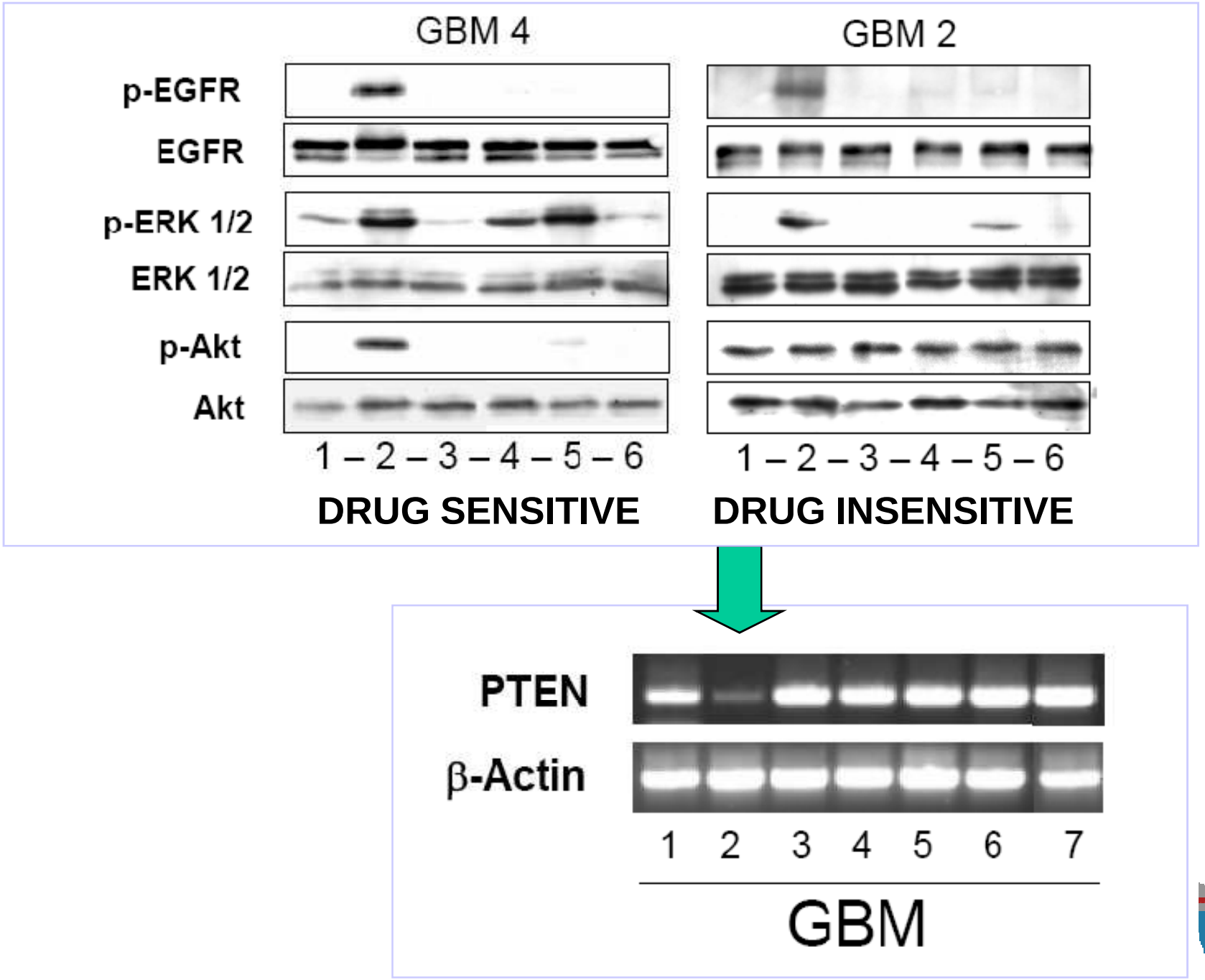

CD133
MAP2 GFAP Hoechst
α-mouse α-rabbitt Hoechst
GBM 1
GBM 2
GBM 3
GBM 4
GBM 5
GBM 6
GBM 7


A


B


ERLOTINIB 5μM
Cell survival (% of T0)
120
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
Time (hrs.)
GBM 1
GBM 2
GBM 3
GBM 4
GBM 5
GBM 6
GBM 7


GEFITINIB 5μM
Cell survival (% of T0)
120
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
Time (hrs.)
GBM 1
GBM 2
GBM 3
GBM 4
GBM 5
GBM 6
GBM 7


GBM 4
GBM 2
p-EGFR
EGFR
p-ERK 1/2
ERK 1/2
p-Akt
Akt
1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 6
1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 6
DRUG SENSITIVE
DRUG INSENSITIVE
PTEN
β-Actin
1 2 3 4 5 6 7
GBM

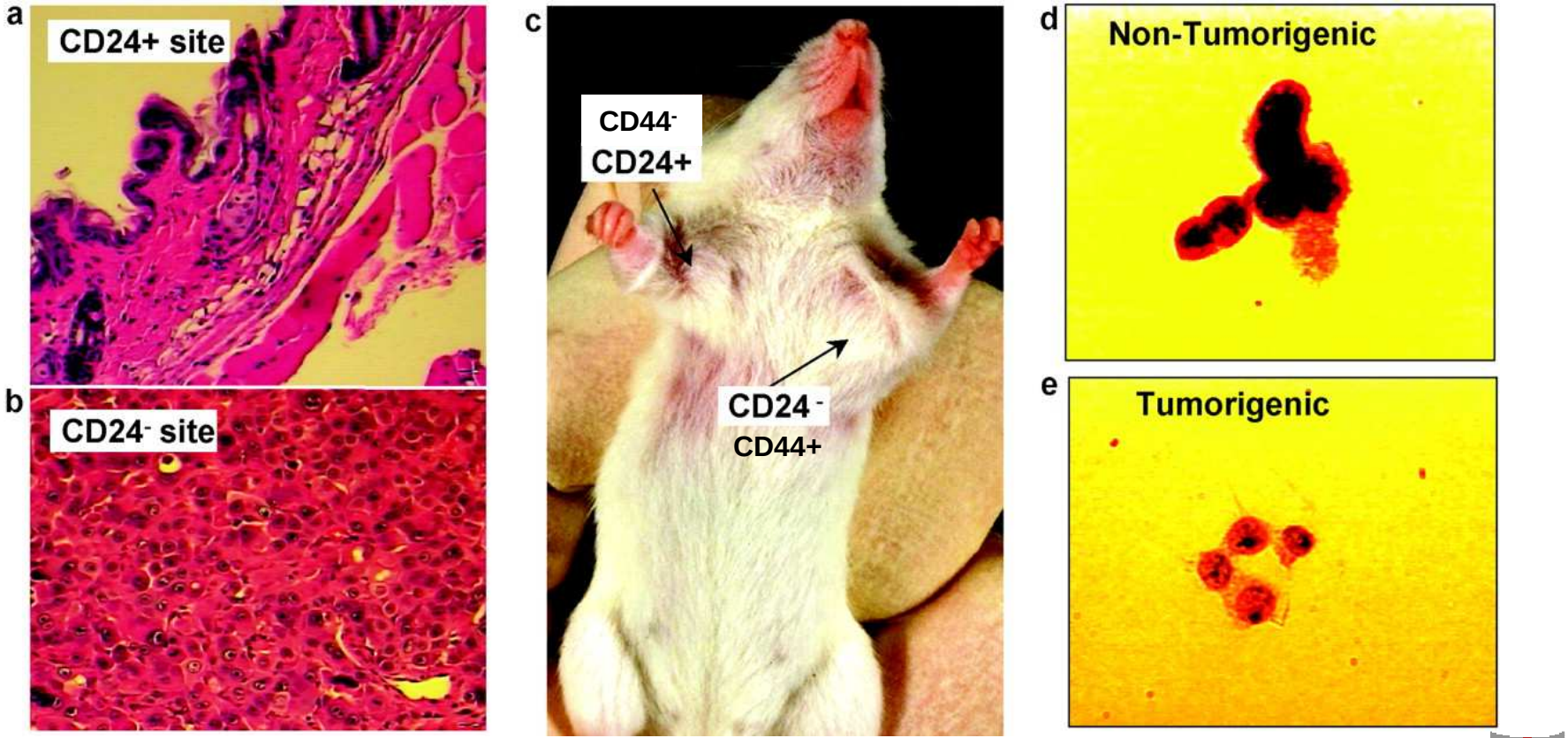
PROGETTO DI RICERCA:

- CELLULE STAMINALI TUMORALI DA CARCINOMA MAMMARIO:

  caratterizzazione biologica e valutazione di possibili approcci farmacologici innovativi

Breast Cancer Stem Cells: $CD44^{+}\ CD24^{low}\ Lin^{-}\ B38.1^{+}\ ESA^{+}$

CD44 and CD24 – adhesion molecules
B38.1 – breast/ovarian cancer-specific marker
ESA – epithelial specific antigen

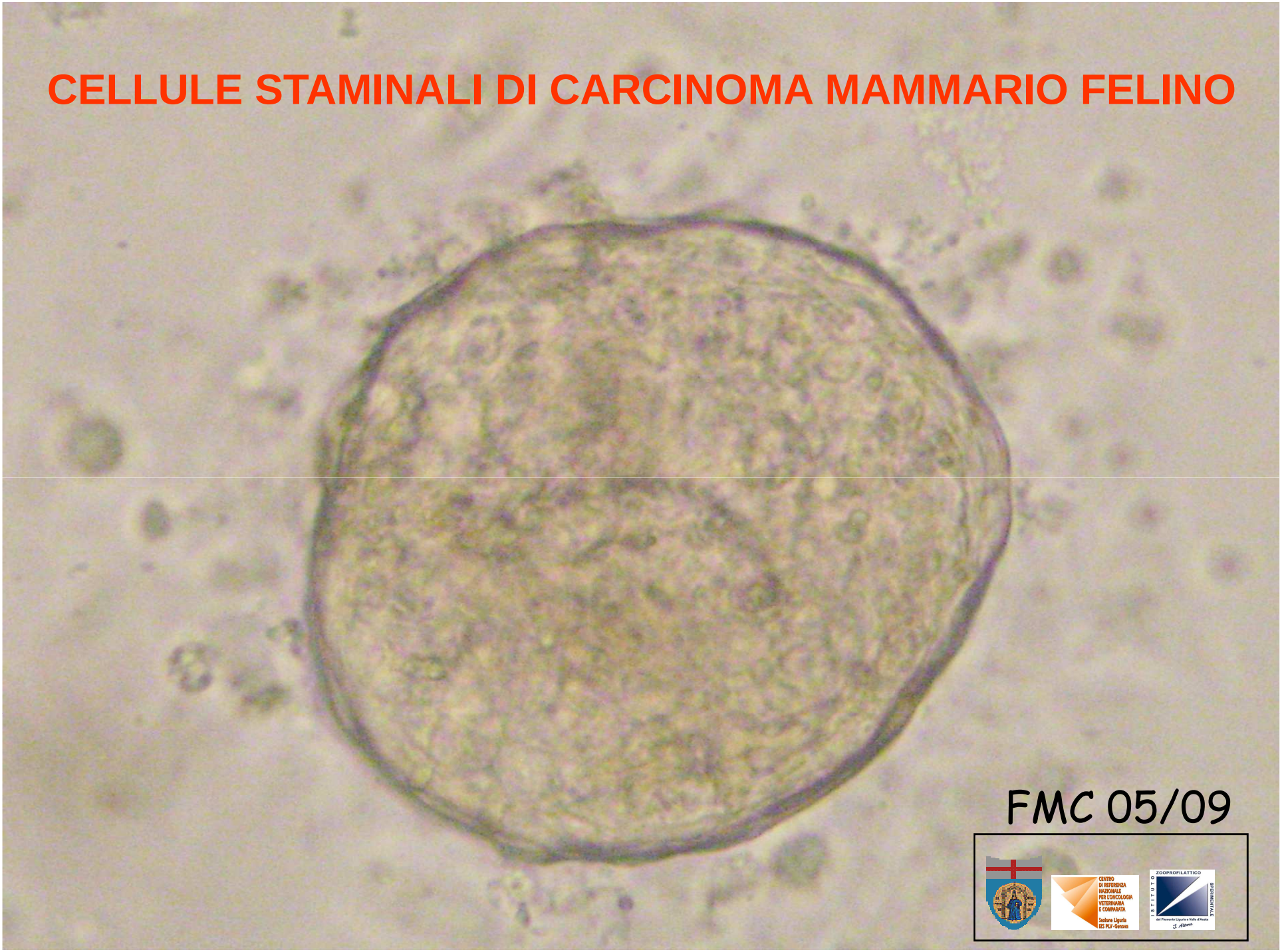


Al-Hajj (2003) PNAS 100, 3983

Approccio sperimentale:

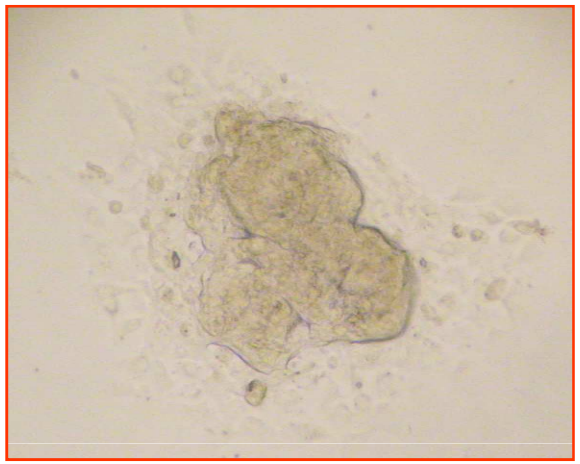
- Carcinoma mammario felino *spontaneo* come modello per lo studio del comportamento biologico e sensibilità ai farmaci del carcinoma umano

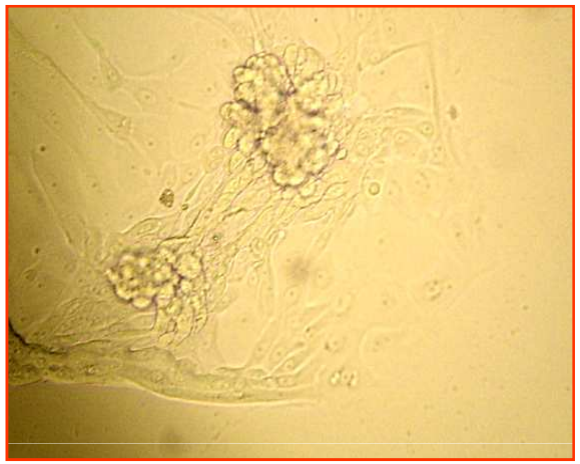
CELLULE STAMINALI DI CARCINOMA MAMMARIO FELINO

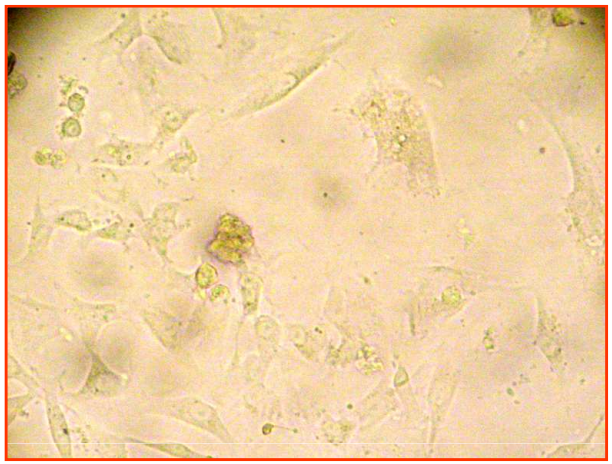


FMC 05/09

CELLULE STAMINALI DI CARCINOMA MAMMARIO FELINO







TEMPO (giorni)

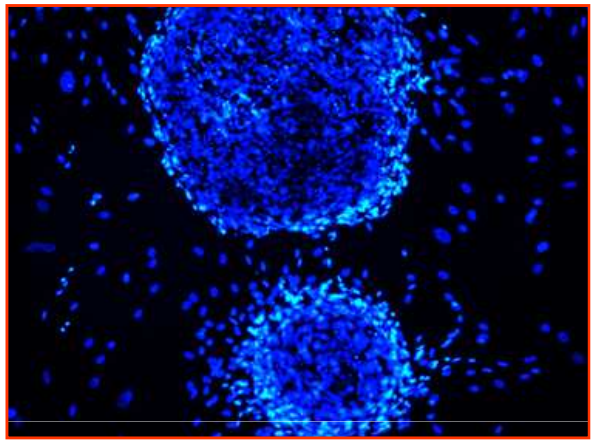
Le cellule staminali di carcinoma mammario felino (FMC) differenziano in cellule tumorali non staminali rimuovendo i fattori di crescita dal mezzo di coltura

FMC 05/09

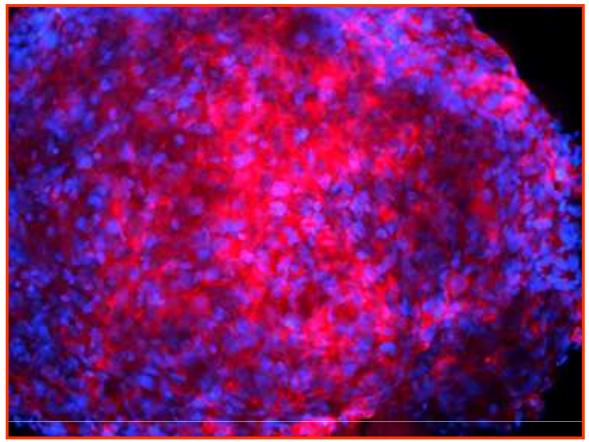
CELLULE STAMINALI DI CARCINOMA MAMMARIO FELINO



Campo chiaro



Colorazione nucleare con DAPI

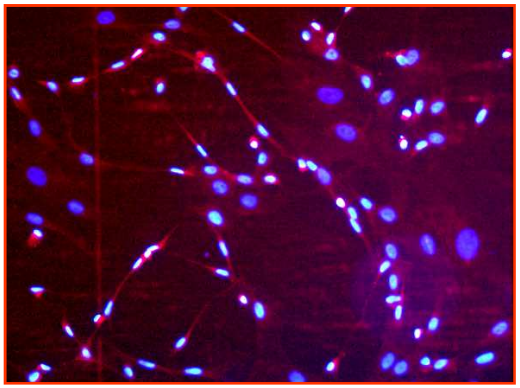


DAPI + EMA (marcatore epiteliale)

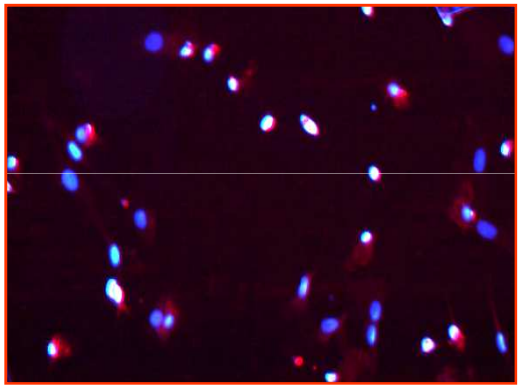
MAMMOSFERE FELINE

FMC 03/08

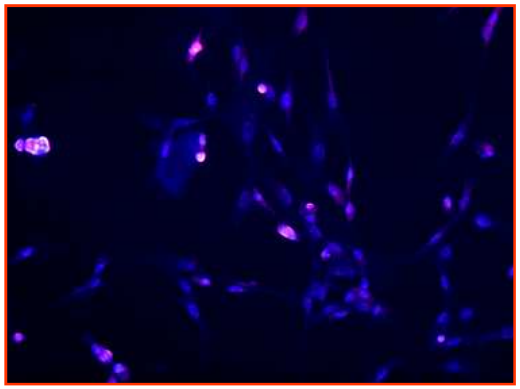
CELLULE STAMINALI DI CARCINOMA MAMMARIO FELINO



DAPI + Citocheratina-18
(marcatore epiteliale)



DAPI + CD44
(marcatore di cellule staminali tumorali di carcinoma mammario)



DAPI + ER

FMC 03/08 PURIFICATO DA FIBROBLASTI

Self-renewal Assay in topi NOD/SCID:
impianto chirurgico ortotopico

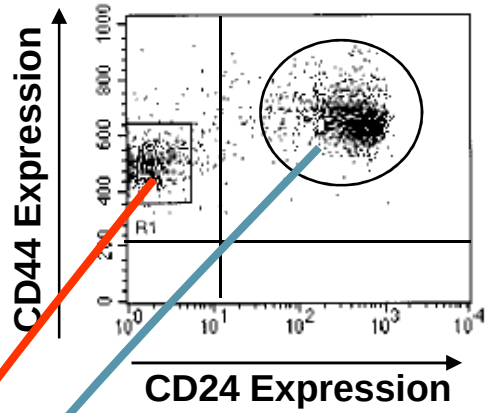


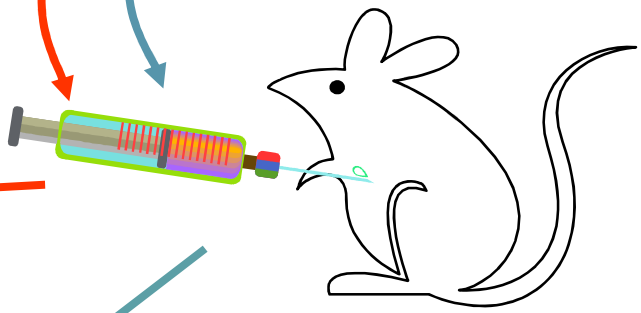
Tumore

Formazione di Sfere

Sospensione di Cellule Isolate

FACS Cell Sorter





Sviluppo di nuovi tumori con caratteristiche simili al tumore originale

Assenza di sviluppo tumorale







FARMACOLOGIA
FACOLTA' DI MEDICINA
UNIVERSITA' DEGLI STUDI
DI GENOVA

CEROVEC IZS-PLV

TULLIO FLORIO

LO FERRARI

ADRIANA
FEDERI
GATTI
ALESS
TAROZZI
ROLA PORCILE

ALESSANDRA RATTO
UMBERTO CARDELLINO

GRAZIE PER L'ATTENZIONE