

Cellule Staminali nel Tumore della Mammella: dal Laboratorio alla Pratica Clinica

MARIA GRAZIA DAIDONE, CLAUDIA CASARSA, MARA BINDA,
NADIA ZAFFARONI

■ Unità Operativa Ricerca Traslazionale, Dipartimento di Oncologia Sperimentale e Laboratori, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Via Venezian, 1 - 20133 Milano

Nei tessuti adulti normali, il mantenimento della popolazione cellulare si deve ad una piccola frazione di cellule, le cellule staminali, che si dividono asimmetricamente autorinnovandosi e dando origine a progenitori cellulari che, dopo un numero limitato di divisioni, producono cellule differenziate tessuto-specifiche, non più in grado di dividersi. È ampiamente accertato che i tumori sono entità eterogenee per quanto riguarda il potenziale proliferativo, fenotipico e tumorigenico, e recentemente si è dimostrato che esiste, all'interno della massa neoplastica, una frazione numericamente esigua di cellule (1-2% dell'intera popolazione tumorale) che è la sola in grado di rigenerare il tumore in vivo, mentre popolazioni di cellule più differenziate mancano di questa proprietà. Tali cellule sono simili alle cellule staminali per alcune caratteristiche, quali l'autorinnovamento, lo stato indifferenziato, la multipotenzialità (ovvero la capacità di generare cellule mature appartenenti a diversi stipiti cellulari). In base a queste e ad altre evidenze sperimentali si è così giunti a ritenere che il tumore origini da una cellula staminale adulta, anziché da una qualsiasi cellula somatica, oppure da una cellula che riacquisisce caratteristiche di staminalità, e in tale contesto lo sviluppo della neoplasia viene ad essere considerato un'organogenesi aberrante originata e sostenuta da cellule staminali mutate, denominate cellule staminali tumorali.

La dimostrazione formale della presenza di una frazione di cellule autorinnovantesi che, seppur esigua, è in grado di rigenerare il tumore si è inizialmente avuta nella leucemia mieloide acuta grazie alla disponibilità di sistemi sperimentali per l'identificazione dei fenotipi caratterizzanti i differenti stipiti cellulari (1) e alla dimostrazione della capacità di ripopolazione delle cellule staminali leucemiche in idonei

modelli murini (2). Recentemente sono state messe a punto condizioni sperimentali per l'isolamento e la propagazione di cellule staminali/progenitori oltre che nei mielomi (3) anche da neoplasie solide. Utilizzando tecniche impiegate per l'isolamento di cellule staminali da tessuti normali (basate su un approccio prospettico - quale l'isolamento in base all'espressione di marcatori di superficie o alla capacità di escludere il colorante vitale Hoechst 33342, o funzionale - quale la crescita clonale in vitro come sfere non adese) si è così giunti alla dimostrazione dell'esistenza di cellule che presentano alcuni dei caratteri di staminalità nei tumori del sistema nervoso centrale (4-6), nei carcinomi della mammella (7-10), della prostata (11), dell'ovaio (12), del colon (13,14), della testa e collo (15) e del pancreas (16), negli epatocarcinomi (17) e nei melanomi maligni (18). Tali cellule - diversamente dalla popolazione cellulare di origine - presentano un elevato potenziale tumorigenico poiché in grado di dar origine a tumore quando inoculate nell'animale a concentrazioni molto basse (*Tabella 1*). Si è inoltre dimostrato che la frazione con caratteristiche di staminalità è quantitativamente modesta, e che la restante popolazione cellulare è destinata a differenziamento e senescenza. Mentre cellule staminali normali e tumorali condividono molte caratteristiche molecolari e funzionali, la regolazione dell'autorinnovamento cellulare attraverso i pathways di Wnt, BMI-1, Notch, Hedgehog, operativo e strettamente controllato nelle cellule staminali normali, è del tutto alterata nelle cellule staminali tumorali e la conoscenza delle alterazioni molecolari che lo sostengono (e che già caratterizzano molte neoplasie solide e sistemiche) viene ad essere cruciale per l'identificazione di bersagli molecolari per interventi terapeutici potenzialmente altamente selettivi. Gli attuali trattamenti, disegnati principalmente contro le cellule proliferanti, sono infatti indirizzati ad una riduzione dell'intera massa tumorale e non necessariamente ad un annientamento della frazione staminale/tumorigenica caratterizzata -per contro- da una elevata espressione di proteine appartenenti alla famiglia dei trasportatori di membrana ABC (che favo-

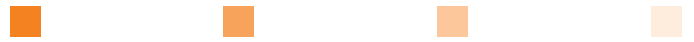


Tabella 1. Isolamento da tumori umani di cellule staminali/progenitori ad elevato potenziale tumorigenico

Tipo tumorale	Metodo/marcatore utilizzato per l'isolamento	Riferimento bibliografico
Leucemia mieloide acuta	CD34+CD38- lineage-	2
Mieloma multiplo	CD138-/CD134-	3
Tumori cerebrali	CD133+ Crescita <i>in vitro</i> come sfere in sospensione	4 - 6
Carcinoma mammario	CD44+CD24- ^{basso} lineage- ALDH1+ Crescita <i>in vitro</i> come sfere in sospensione	7 - 10
Carcinoma prostatico	CD44+/ α 2 β 1 ^{high} /CD133+	11
Carcinoma ovarico	Crescita <i>in vitro</i> come sfere in sospensione	12
Carcinoma del colon	CD133+	13 - 14
Tumori del cavo orale	CD44+ lineage-	15
Tumori del pancreas	CD44+CD24+ESA+	16
Epatocarcinoma	CD90+	17
Melanoma	Crescita <i>in vitro</i> come sfere in sospensione	18

risono l'efflusso cellulare di farmaci e sono coinvolti nella resistenza a farmaci quali paclitaxel, cisplatino, 5-fluorouracile, mitoxantrone, methotrexate, antracicline, etoposide, alcaloidi della vinca, camptotecine, topotecan, imatinib), da alterazioni nei meccanismi di riparazione del DNA, dalla presenza di fattori citoprotettivi, quali attivazione di telomerasi ed elevata espressione di fattori anti-apoptotici, e da una relativamente modesta velocità di crescita a fronte di un elevato potenziale proliferativo. Il trattamento, pertanto, malgrado provochi una significativa riduzione della massa tumorale (attualmente considerata indicatore di risposta clinica e, conseguentemente, di sopravvivenza del paziente) può lasciare del tutto inalterata la frazione di cellule staminali tumorali, in grado quindi di proliferare e rigenerare la neoplasia sia a livello locale sia a distanza. Per l'eradicazione del tumore è ipotizzabile sia quindi necessario bersagliare direttamente la cellula staminale tumorale/progenitore tumorigenico (Figura 1).

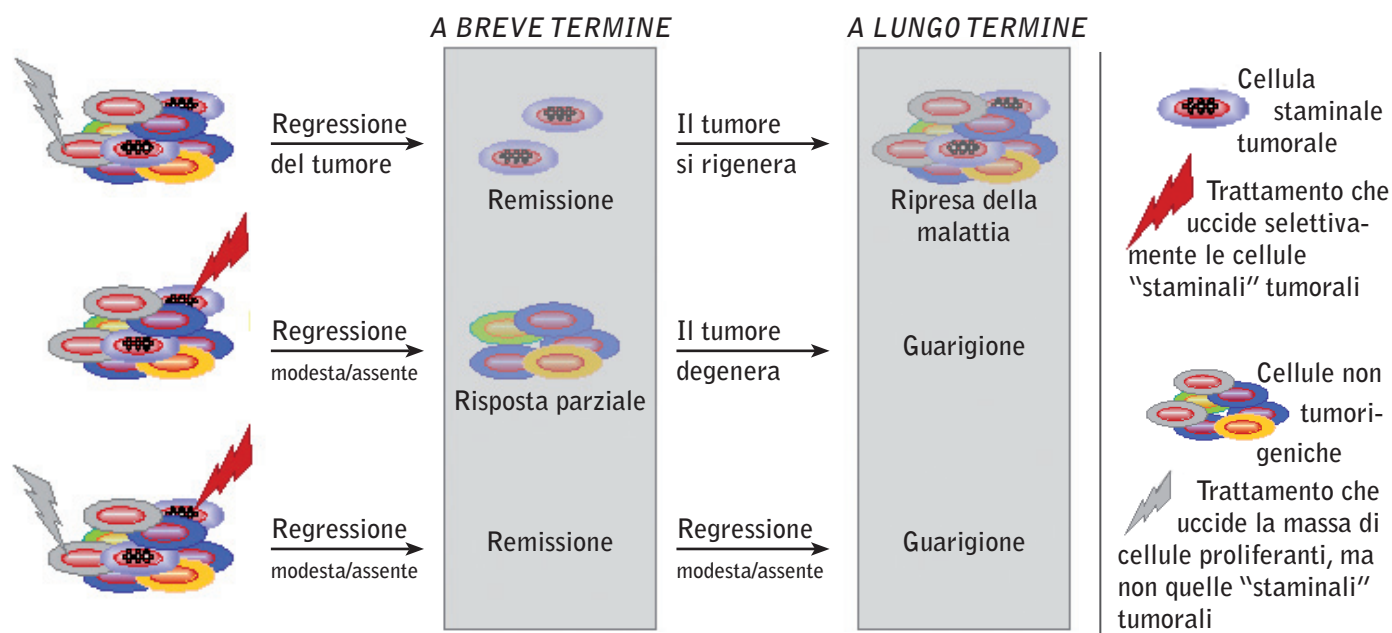
A tale scopo sono in corso studi per identificare le alterazioni molecolari che sostengono in maniera funzionalmente non ridondante l'autorinnovamento delle cellule ad elevato potenziale tumorigenico e per disegnare e validare a livello preclinico molecole che interferiscano su tali targets.

Per il carcinoma della mammella è stato recentemente dimostrato il significato prognostico di alterazioni molecolari a carico di pathways coinvolti nell'autorinnovamento. In particolare: *Wnt*: implicato nella tumorigenesi e nel mantenimento di un pool di cellule staminali/progenitori nella ghiandola mammaria, è coinvolto in un cross-talk con i recettori

per gli ormoni steroidei attraverso pathways comuni e si è dimostrato che l'interferenza sulla sua funzionalità attraverso antagonisti specifici o siRNA aumenta l'espressione di marcatori di differenziamento. Hanno un significato prognostico β -catenina (19), la cui localizzazione intracellulare è differenzialmente associata con il decorso della malattia (favorevole per l'espressione citoplasmatica, sfavorevole per l'espressione nucleare) e SFRP-1 (secreted frizzled-related protein-1), la cui metilazione del promotore è un fattore sfavorevole (20,21).

Hedgehog: alterazioni di questo pathway sono implicati nello sviluppo di differenti patologie neoplastiche, inclusa la patologia mammaria. In particolare, Sonic Hedgehog identifica carcinomi mammari infiammatori a differente aggressività biologica (22), mentre la ciclopamina, un alcaloide che interferisce specificamente sul pathway di Hedgehog, riduce l'espressione di Gli1 e rallenta significativamente la crescita tumorale (23). *BMI-1* è uno dei componenti del complesso Polycomb indot-

Figura 1. Efficacia delle terapie antitumorali in relazione alla presenza di "cellule staminali tumorali": i trattamenti convenzionali potrebbero ridurre la massa tumorale senza eradicare le "cellule staminali tumorali", mentre farmaci che selettivamente colpiscono queste ultime potrebbero per contro non ridurre significativamente la massa tumorale che tuttavia non è più in grado di rigenerare il tumore. L'associazione tra le due strategie terapeutiche potrebbe fornire i risultati migliori per l'eradicazione della malattia.



to attraverso il pathway di segnalazione di hedgehog responsabile dell'auto-rinnovamento di cellule staminali normali e leucemiche, reprime geni che inducono senescenza e morte cellulare e immortalizza cellule dell'epitelio mammario umano. Un profilo molecolare basato sull'espressione di 11 geni presenti nel pathway di BMI-1 sembra essere un forte e solido indicatore prognostico, in termini sia di ripresa globale che di metastasi a distanza e di morte, in 11 neoplasie epiteliali e non, comprendenti anche il carcinoma mammario (24).

Notch: ha un ruolo importante in diverse patologie neoplastiche (25); *Notch 4* è associato alla tumorigenesi murina e alla proliferazione delle mammosfere (ovvero, delle cellule

staminali/progenitori che crescono in sospensione come sfere non adese), tanto che il trattamento con un anticorpo diretto contro *Notch 4* sopprime drasticamente la formazione di sfere sia primarie sia secondarie (10,26). Elementi di questo pathway hanno un significato prognostico in questa patologia (10,27-29).

Per quanto riguarda la cellula staminale della ghiandola mammaria, recenti evidenze depongono per una sua negatività recettoriale e per la presenza di recettori per estrogeni (ER) nei progenitori e nelle cellule più differenziate. Il momento dello stadio di differenziamento del lineage cellulare al quale corrisponde la trasformazione neoplastica viene ad essere determi-



nante per la storia clinica della neoplasia (Figura 2). Infatti, se la trasformazione neoplastica insorge nella cellula staminale, senza recettori per estrogeni, è verosimile che il tumore sarà di tipo basale, indifferenziato, a prognosi sfavorevole e poco responsivo alle terapie ormonali. Per contro, un tumore generato da cellule ben differenziate, apparterrà verosimilmente al sottotipo luminale A, caratterizzato da buona prognosi ed elevata probabilità di risposta al trattamento ormonale. Ovviamente, al progenitore parzialmente differenziato corrisponderà un tumore con un comportamento clinico e biologico estremamente eterogeneo. Sono attualmente disponibili le prime evidenze sperimentali che dimostrano l'efficacia di nuovi agenti terapeutici sull'autorinnovamento di cellule staminali/progenitori normali (25,26,30). Tuttavia, lo stato attuale delle conoscenze depo-

ne per una situazione decisamente più complessa di quanto non appaia dagli incoraggianti risultati preliminari, a livello dell'identificazione sia di marcatori di staminalità, sia di di nuovi bersagli per farmaci innovativi, sia di un modello peculiare per studiare in vitro/in vivo nuove modalità terapeutiche (31). Infatti, come ottimamente messo in evidenza in uno Special Workshop Report recentemente pubblicato su Cancer Research (32):

1. la definizione di cancer stem cell è squisitamente operativa (cellula in grado di autorinnovarsi e dar luogo a stipiti cellulari differenti, in grado di rigenerare continuamente un tumore);
2. l'isolamento e la propagazione di cellule staminali/progenitori è estremamente difficile - in mancanza di marcatori che chiaramente identificano la staminalità come nel caso di leucemie e tumori cerebrali - nei tumori solidi e si basa essenzialmente su saggi funzionali in vivo e su condizioni sperimentali non propriamente fisiologiche;

3. la crescita in vivo richiede una complessa standardizzazione e tempi di crescita molto lunghi, ovvero condizioni difficilmente utilizzabili per uno screening farmacologico su larga scala;

lunghi, ovvero condizioni difficilmente utilizzabili per uno screening farmacologico su larga scala;

4. per contro, un saggio in vitro deve essere a) standardizzato e riproducibile, b) quantitativo, c) altamente specifico, d) sufficientemente sensibile, e) rapido.

Oltre a queste condizioni, ancora largamente da mettere realmente a punto nella pratica di laboratorio, restano ancora molti quesiti, sia speculativi sia tecnici, a cui rispondere prima di poter valutare quanto le conoscenze sulla biologia delle cellule staminali/progenitori di cellule tumorali possano contribuire ad una diagnosi precoce, ad

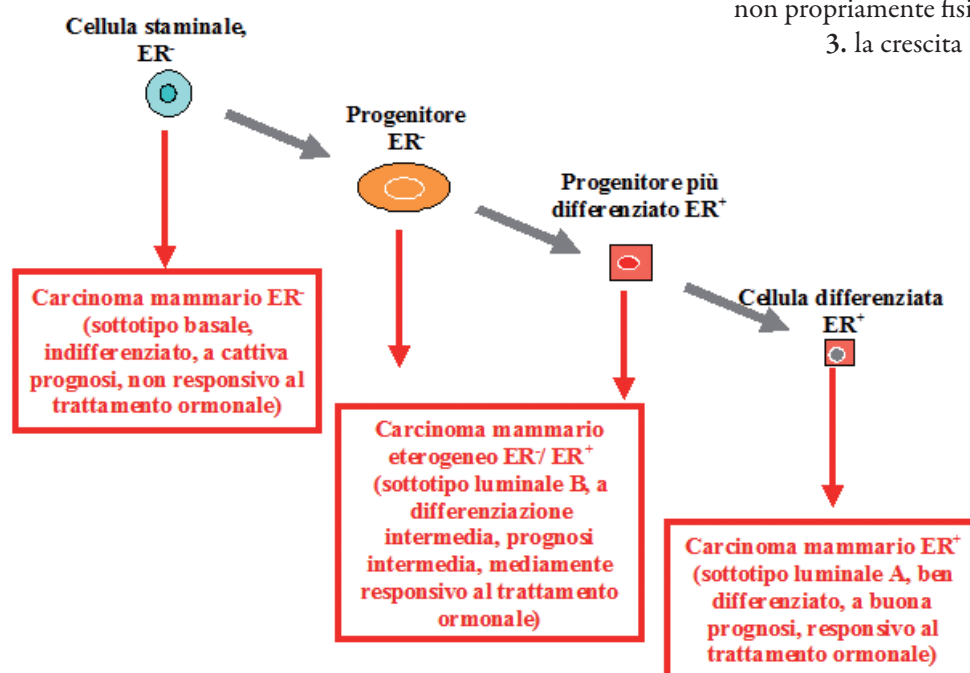


Figura 2. Relazione tra stadio di differenziamento del lineage cellulare e tipologia del tumore

Bibliografia

1. Siminovitich et al., J Cell Physiol 1963;62:327-36.
2. Bonnet D, Dick JE. Nat Med 1997;3:730-7.
3. Matsui W, et al. Blood 2004;103:2332-6.
4. Hemmati et al., PNAS 2003; 100:15178-83.
5. Singh S, et al. Nature 2004;432:396-401.
6. Galli R et al., Cancer Res 2004; 64:7011-21.
7. Al-Hajj M, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:3983-8.
8. Ginestier C et al. Cell Stem Cell 2007;1:555-67.
9. Ponti D, et al. Cancer Res 2005;65:5506-11.
10. Farnie G et al. J Natl cancer Inst 2007;99:616-27.
11. Collins AT, et al. Cancer Res 2005;65:10946-51.
12. Bapat SA, et al. Cancer Res 2005;65:3025-9.
13. Ricci-Vitiani L, et al. Nature 2007;445:111-5.
14. O'Brien CA, et al. Nature 2007;445:106-10.
15. Prince ME, et al. PNAS 2007;104:973-8.
16. Li C et al. Cancer Res 2007;67:1030-7.
17. Yang ZF et al. Cancer Cell 2008;13:153-166.
18. Fang D, et al. Cancer Res 2005;65:9328-37.
19. Nakapoulou L, et al. Mod Pathol 2006;19:556-63.
20. Lo PK, et al. Cancer Biol Ther 2006;5:281-6.
21. Veeck J, et al. Oncogene 2006;25:3479-88.
22. Bièche I, et al. Clinical Cancer Res 2004;10:6789-95.
23. Kubo M, et al. Cancer Res 2004;64:6071-4.
24. Glinisky GV, et al. J Clin Invest 2005;115:1503-21.
25. Stylianou S, et al. Cancer Res 2006;66:1517-25.
26. Dontu G, et al. Breast Cancer Res 2004;6:605-15.
27. Parr C, et al. Int J Mol Med 2004;4:779-86.
28. Reedijk M, et al. Cancer Res 2005;65:8530-7.
29. Colaluca IN, et al. Nature 2008;451:76-81.
30. Liu M, et al. Cancer Res 2006;66:6063-71.2007
31. Hill RP. Cancer Res 2006;66 :1891-6.
32. Clarke MF, et al. Cancer Res 2006;66:9339-44.
33. Liu R, et al. N Engl J Med 2007;356:217-26.
34. Phillips TM, et al. J Natl Cancer Inst 2006;98 :1777-85.

una miglior risoluzione prognostica e allo sviluppo di molecole mirate contro alterazioni molecolari associate alla staminalità tumorale. Tuttavia, le più recenti pubblicazione aventi come oggetto informazioni acquisite dalla caratterizzazione molecolare (33) e dal profilo di radiosensibilità (34) di cellule staminali/progenitori isolate da tumori clinici così come da linee cellulari stabilizzate da carcinoma mammario avallano una possibile applicabilità clinica a medio termine di questo modello sperimentale. Infatti, il profilo di espressione genica derivato da cellule con caratteristiche di staminalità isolate da 6 tumori clinici, seppur indicativo di alterazioni nei geni di invasività piuttosto che in quelli coinvolti nell'auto-rinnovamento, si dimostra predittore di sopravvivenza globale e libera da malattia non solo su casistiche di carcinoma mammario, ma anche su neoplasie di differente istologia, quali il carcinoma polmonare e prostatico e il medulloblastoma. Inoltre, esistono preliminari dimostrazioni formali, ottenuta da mammosfere propagate in vitro, che tali cellule sono relativamente più radioresistenti della popolazione da cui sono state isolate ma mostrano una spiccata sensibilità a farmaci contro specifici bersagli molecolari (Tabella 2).

Tabella 2. Approcci terapeutici contro cellule staminali/progenitori ad elevato potenziale tumorigenico nel carcinoma mammario

Modello sperimentale	Agenti chimici/ fisici/ biologici studiati	Valutazione dell'attività	Riferimento bibliografico
Mammosfere da linee stabilizzate di carcinoma	Radiazioni ionizzanti	Fenotipo, autorinnovamento e marcatori molecolari di radiosensibilità	34
Mammosfere da DCIS	Gefitinib, antagonista di Notch 4	Autorinnovamento	10
Mammosfere da cellule epiteliali normali	Antagonista di Notch	Autorinnovamento e differenziamento	26
Mammosfere da cellule epiteliali normali/tumorali	Ciclopamina	Autorinnovamento, differenziamento e tumorigenesi	30