



Fondazione
Pezcoller

AACR American Association
for Cancer Research

PREMIO INTERNAZIONALE FONDAZIONE PEZCOLLER – AACR 2020

Dr. John E. Dick

Princess Margaret Cancer Center, UHN, Toronto (Canada)

LE CELLULE STAMINALI HANNO UN RUOLO FONDAMENTALE NELLE LEUCEMIE, FIN DALL'INIZIO

Il cancro è spesso considerato un tessuto omogeneo, ma in realtà è costituito da un insieme di *cellule diverse* fra loro, nelle quali la capacità di crescita, il metabolismo ed altre proprietà specifiche delle cellule tumorali, sono presenti in varia misura. Di conseguenza, diversa è anche la loro sensibilità alle terapie, la tendenza alla progressione e alla recidiva.

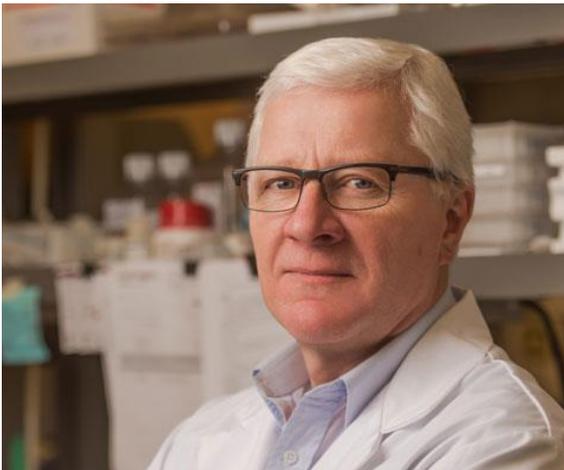
La domanda quindi, è *quanto ogni cellula contribuisca alla crescita del tumore e se ciò sia una prerogativa di tutte o solo di un numero limitato di cellule*. Sappiamo infatti che in molti tessuti sani solo le cellule staminali mantengono nel tempo la capacità di replicarsi, per consentire la possibilità dei tessuti di rigenerarsi.

Già da qualche decennio sapevamo che la capacità replicativa delle singole cellule tumorali è molto variabile e che non tutte riescono a sopravvivere nel lungo periodo. Fin dai primi anni 60 infatti, gli studi con la Timidina Triziata (che viene incorporata nel DNA delle cellule in divisione), avevano dimostrato che nei pazienti con leucemia acuta, la maggior parte dei blasti (cellule immature) circolanti, non era in fase di attiva moltiplicazione, ma veniva continuamente rifornita solo da una piccola quota (<10%) di cellule proliferanti. È stato poi visto che si trattava di 2 popolazioni cellulari distinte: una più abbondante, capace di replicarsi rapidamente nel giro di 24 ore, l'altra, meno abbondante, a lenta replicazione, capace di restare inattiva anche per settimane o mesi.

Era questo un risultato inaspettato, ma che ha permesso però di capire che *le terapie anti proliferative, con cui agisce la chemioterapia, potevano essere efficaci solo sulle cellule rapidamente proliferanti*, mentre risparmiavano le cellule meno attive (dormienti).

Queste erano le cellule *responsabili poi della recidiva* dei pazienti.

Intorno a quegli anni, fu poi sviluppato un nuovo terreno di coltura (soft agar), per le cellule leucemiche proliferanti e si vide che in realtà solo 1 su 100 di queste cellule aveva la capacità di crescere e formare colonie. Le cellule di queste colonie però non erano tutte uguali, come dimostrato da Jim Griffin. La maggioranza di loro esprimeva un recettore (CD33) ma non tutte: alcune poche non lo esprimevano, ed era la prova che le cellule della **Leucemia Mieloide Acuta (LMA)** *non sono tutte uguali*. Non era ancora chiaro però se la LMA fosse costituita da popolazioni cellulari distinte (dormienti, proliferanti o non proliferanti) o se le cellule leucemiche fossero in realtà identiche e potessero in qualche modo passare da uno stato proliferativo ad un altro.



Una risposta a queste domande, venne dai nuovi studi compiuti nel mio laboratorio sul sangue di soggetti sani. Avevamo precedentemente dimostrato per primi la possibilità di trapiantare con successo le cellule umane ematopoietiche (progenitrici delle cellule del sangue) nel topo privato del sistema immunitario (incapace di rigetto). Con questo sistema (xenograft assay), avevamo visto che si sviluppavano tutte le linee cellulari del sangue normale, ma abbiamo visto poi che funzionava anche con le leucemie: la

Leucemia Linfoblastica Acuta (B-ALL) e le Leucemie Mieloidi Acute (LMA) e Croniche (LMC). Questo è ora considerato il sistema di riferimento per il rilevamento delle cellule staminali umane, sia normali che leucemiche.

Il test chiave per capire se anche nella LMA esistesse una gerarchia dei diversi tipi cellulari, arrivò quando riuscimmo a purificare 4 distinte sottopopolazioni di cellule staminali, sulla base della colorazione dei loro antigeni. Ciascuna di queste 4 sottopopolazioni, fu poi trapiantata nel modello animale, per testarne la capacità di scatenare la leucemia. Se tutte avessero provocato la leucemia, significava che tutte le cellule erano identiche tra loro, ma non fu così. Scoprimmo infatti che solo una di quelle sottopopolazioni di cellule era in grado di sviluppare la leucemia, ma che da questa potevano poi derivare nuovamente tutte le 4 sottopopolazioni.

Provammo allora a trapiantare ripetutamente questa sottopopolazione e questa fu la prova che si trattava di **cellule staminali leucemiche**, capaci di crescita a lungo termine e di autorinnovamento. Era la dimostrazione che *la LMA è organizzata gerarchicamente e sostenuta da cellule staminali leucemiche capaci di auto-rinnovarsi*.

Con la determinazione del profilo genetico di queste cellule staminali e l'analisi computazionale dei dati clinici, potemmo poi dimostrare che il loro profilo genetico era predittivo della risposta al trattamento e del decorso clinico dei pazienti.

Non lo era invece il profilo nelle cellule leucemiche non-staminali. Su questa base sono stati sviluppati i *test prognostici e predittivi per la Leucemia Mieloide Acuta, che sono ora in fase di valutazione clinica*. Sempre sulla stessa base, noi ed altri, abbiamo potuto iniziare a **sviluppare nuove terapie della LMA**, allo scopo di distruggere specificamente le cellule staminali leucemiche.

Sapevamo a questo punto che le cellule staminali leucemiche rappresentano un insieme eterogeneo, composto da un mix di sub-cloni geneticamente distinti. Ci siamo chiesti allora, se le cellule staminali che danno origine a ciascun sub-clone fossero anch'esse diverse geneticamente.

È stato uno studio molto complesso, partito dai campioni di sangue ottenuti da pazienti con LMA e LLA, al momento della diagnosi e della recidiva. Siamo così riusciti a dimostrare, non solo che alla diagnosi le cellule staminali leucemiche erano geneticamente diverse, ma anche la presenza di alcuni rari sub-cloni, che presentavano già il profilo genetico delle cellule destinate alla recidiva. Questo voleva dire che quelle rare cellule staminali leucemiche contenevano già i "germi" della ricaduta, molto prima del momento della diagnosi.

La dimostrazione che la recidiva nei pazienti è strettamente legata alle proprietà intrinseche delle cellule staminali leucemiche, è la prova della loro importanza fondamentale. Abbiamo visto infatti, che presentano specifici programmi metabolici e di resistenza genetica, che conferiscono loro la capacità di sopravvivere alle terapie e causare la recidiva. Sulla base di questi dati sono iniziati gli studi su nuove categorie di farmaci specifici, da usare fin dal momento della diagnosi, prima che queste sottopopolazioni possano crescere e causare la recidiva.

Dai nostri studi sulle cellule staminali dei pazienti leucemici è derivata anche un'altra importante scoperta, del tutto fortuita, che ci ha permesso di chiarire le primissime fasi dell'inizio della leucemia. Nei campioni di sangue per la diagnosi di leucemia infatti, sono normalmente contenuti un grande numero di cellule leucemiche, ma anche un 10-20% di cellule normali. Quando siamo andati ad analizzare queste ultime, abbiamo visto che non sono completamente normali, ma possono contenere anch'esse una mutazione, identica a quella contenuta nelle cellule leucemiche. Questo è un dato di straordinaria importanza, perché ci ha fatto capire che quelle cellule apparentemente normali, derivano anch'esse da una cellula staminale mutata, che è lo stesso antenato delle cellule della Leucemia Mieloide Acuta. Le abbiamo chiamate **cellule staminali ematopoietiche pre-leucemiche**: sono loro all'origine della LMA.

Se tutto questo è vero, è inevitabile un'altra importante domanda: quando inizia la malattia prima della diagnosi e, soprattutto, si possono identificare i portatori di tali cellule pre-leucemiche nella popolazione generale, ancora prima che si sviluppi la leucemia mieloide acuta?

La risposta ci è arrivata dall'analisi del sangue di numerosi gruppi di persone seguite per molto tempo (coorti).

Tra loro, abbiamo trovato le cellule staminali pre-leucemiche, ma solo in quelli che hanno poi sviluppato LMA nell'arco di un decennio. È anche questo un dato di enorme importanza, perché permette di identificare le persone a rischio di sviluppare la leucemia ed apre la possibilità di sviluppare opportune strategie di prevenzione.

In conclusione, abbiamo potuto chiarire con i nostri studi, l'intero arco di sviluppo della leucemia, dalla cellula di origine, con la mutazione iniziale, all'espansione clonale e la formazione delle cellule staminali leucemiche geneticamente diverse, fino all'origine delle cellule responsabili della recidiva. Ne consegue che le leucemie devono essere studiate a livello della singola cellula e che le cellule staminali leucemiche, sono la chiave per capire se una cellula potrà rispondere alla terapia o sarà alla fine la causa della recidiva.



Grazie ai nostri studi, possiamo offrire oggi un miglior monitoraggio clinico dei pazienti affetti da leucemia mieloide acuta e leucemia linfoide, oltre alla possibilità di sviluppo di **terapie, in grado di prevenire l'insorgenza della malattia e la recidiva.**

Infine, i nostri studi sulla leucemia sono stati *replicati anche in alcuni tumori solidi*, nei quali è stato possibile identificare le cellule staminali tumorali, ad indicare che il concetto di gerarchia cellulare tumorale può essere alla base anche di diverse altre tipologie di cancro.