

THE PONTIFICAL  
ACADEMY OF  
SCIENCES

EXTRA SERIES

39

WORKING GROUP ON  
NEW DEVELOPMENTS IN STEM CELL  
RESEARCH: INDUCED PLURIPOTENT  
STEM CELLS AND THEIR POSSIBLE  
APPLICATIONS IN MEDICINE  
16-17 APRIL 2012 • CASINA PIO IV

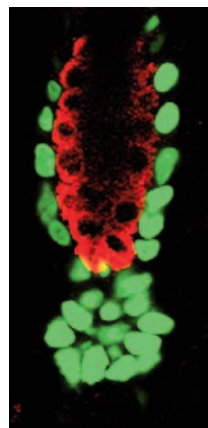
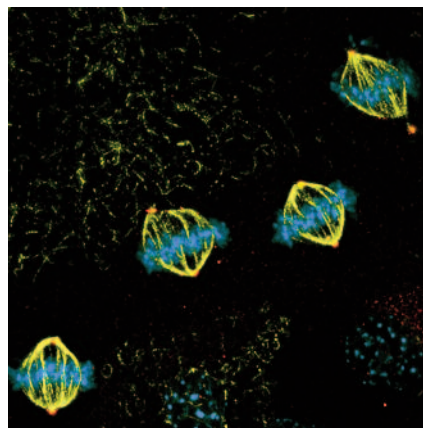
## Foreword • Prefazione

H.EM. GEORGES M.M. CARDINAL COTTIER O.P.

H.E. MSGR. MARCELO SÁNCHEZ SORONDO

## Statement • Dichiarazione

WERNER ARBER, NICOLE LE DOUARIN, ALEJANDRO SÁNCHEZ  
ALVARADO, HANS CLEVERS, IRVING WEISSMAN,  
RUDOLF JAENISCH, AUSTIN SMITH, HELEN BLAU,  
ELAINE FUCHS, ARTURO ALVAREZ-BUYLLA, GIULIO COSSU,  
GRAZIELLA PELLEGRINI, ANGELO VESCOVI, VANIA BROCCOLI,  
CAMILLO RICORDI, RAFAEL VICUÑA



VATICAN CITY  
2012

PONTIFICIA ACADEMIA SCIENTIARVM

EXTRA SERIES 39

WORKING GROUP ON

**NEW DEVELOPMENTS IN STEM CELL  
RESEARCH: INDUCED PLURIPOTENT  
STEM CELLS AND THEIR POSSIBLE  
APPLICATIONS IN MEDICINE**

16-17 APRIL 2012 • CASINA PIO IV

**Statement**

WERNER ARBER, NICOLE LE DOUARIN, ALEJANDRO SÁNCHEZ ALVARADO,  
HANS CLEVERS, IRVING WEISSMAN, RUDOLF JAENISCH, AUSTIN SMITH, HELEN BLAU,  
ELAINE FUCHS, ARTURO ALVAREZ-BUYLLA, GIULIO COSSU, GRAZIELLA PELLEGRINI,  
ANGELO VESCOVI, VANIA BROCCOLI, CAMILLO RICORDI, RAFAEL VICUÑA



VATICAN CITY  
2012

## FOREWORD

We are very pleased to present the Statement of the Workshop on *New Developments in Stem Cell Research: induced Pluripotent Stem Cells and their Possible Applications in Medicine*. As stated by the title itself, the aim of the Workshop was to study iPS (induced Pluripotent Stem) cells. As defined in the following Statement, iPS cells are not derived from any stage of embryonic or fetal development. On the contrary, they derive from a non-pluripotent cell – typically an adult somatic cell – by inducing a “forced” expression of specific genes. They are extremely promising in the development of adult tissue stem cells, which are the goal of regenerative medicine. It is therefore a new gift of science to provide iPS cells which have never come from an embryo or fetus or oocyte; nevertheless, these cells are pluripotent and therefore analogous to ES cells in a certain phase. ES cells, which were not included in the subject of this workshop, are referred to in the present Statement only in relation to iPS cells. Aristotle said that “the knowledge of the act must precede the knowledge of the potency” (*Metaph.* ix, 9, 1049 b 16) and Jesus Christ said that “every tree is known by its own fruit” (*Lk* 6:44). Thus, since iPS cells cannot generate *per se* a human being or a clone, their use does not seem to be contrary to biblical anthropology as taught by the Church, which considers that, unlike other living beings of nature, each human being, since the beginning of his or her conception, is “the only creature on earth which God willed for itself” (*Gaudium et Spes* 24). In thanking our outstanding group of scientists for their important collaboration and hard work and especially Professor Nicole Le Douarin for her exceptional leadership and expertise, we would like to point out that the opinions expressed in this Statement with absolute freedom by the scientists present at our workshop represent only their points of view and not those of the Academy.

H.EM. GEORGES M.M. CARDINAL COTTIER O.P.  
H.E. MSGR. MARCELO SÁNCHEZ SORONDO

# STATEMENT

## **Introductory remarks**

The subject of this workshop was centered on the recently developed technology that produced the so-called “induced Pluripotent Stem cells” (or iPS cells) which represent a serious hope for the emergence of a true regenerative medicine.

This remarkable success in advanced biotechnology arose from the knowledge acquired from the research on the early stages of mammalian development and on the possibility of capturing in culture and perpetuating indefinitely a state of pluripotency of the cells present in the embryo prior to its implantation in the maternal uterus. The cells resulting from this technique were designated “ES cells” (for Embryonic Stem cells). They were the starting point of the present iPS cells.

This statement is divided into two parts: the first concerns general considerations on iPS cells, deduced from contributions of all participants; the second part contains additional contributions that were not extensively included in the first part.

## **Discovery, characteristics and applications of iPS cells**

The survival of multicellular organisms, from plants to animals, depends on the biological activity of *stem cells*. Within any tissue or organ in vertebrates, the only cells that make tissue and repair wounds life-long are stem cells. Throughout our lifetime, these very special and often rare cells within each organ of our body can divide and make mature tissue cells to replenish dead or damaged cells. Remarkably, at the same time, some stem cell daughters remain stem cells, through self-renewal, so that the pool of these master tissue generators remains constant. Often in the course of making a mature cell, the stem cell will first generate a short-lived “committed” cell that divides rapidly before it matures. For example, blood forming stem cells divide to generate one daughter stem cell, while the other daughter cell goes through 20-30 cell divisions with each of these daughters maturing to make a blood cell. In this way, a single stem cell can make 1 million to 1 billion blood cells of all types.

When all tissues of our body are taken into consideration, each human person turns over between 50 to 70 billion cells per day. In a year a normal human will have turned over a mass of cells equivalent to his/her own body weight. With an ever-increasing average lifespan, the amount of cells we must replenish becomes enormous, even in the absence of any serious injury. This is possible because of the biological functions of the stem cells residing in our tissues (blood, skin, gut, etc.). Each tissue stem cell can only make the cells of its tissue, i.e., blood forming stem cells make only blood, skin forming stem cells only make skin cells, intestinal forming stem cells only make intestine, etc.

The ability of adult tissues to self-renew is essential not only for our body to replace the cells lost naturally each day but also to repair tissues when they become injured. Some tissues such as skin have stem cells which can be grown in culture, and this has led to stem cell therapies where badly burned patients who have lost most of their skin stem cells can be saved by culturing the few remaining ones. This strategy has been applied more recently to successfully restore the blindness of patients who have lost most of their corneal epithelial stem cells through injury.

While these examples are long proven success stories of the use of stem cells in medicine, the restricted tissue-forming ability of stem cells and their often small supply in the body limit the types of therapies possible with adult stem cells. Recently, scientists have broken this barrier by tapping into our fundamental knowledge of human development.

Pluripotency, the capacity to generate all cell types of the body, lies at the foundation of development in mammals. A small group of naïve<sup>1</sup> pluripotent cells emerge before the blastocyst implants in the uterus. They remain in a naïve state only transiently before beginning specification towards different lineages. In 1981 scientists discovered that this small group of pluripotent cells could be cultured. In the petri dish, these resulting embryonic stem (ES) cells could self-renew indefinitely while retaining full differentiation potential and pluripotent identity. **Study of ES cells in mammals over the intervening 30 years has revealed unique molecular features that underlie pluripotency.**

These studies have also highlighted profound differences between ES cells from mice and human cell lines. The human cells originally con-

<sup>1</sup> Note that the term “naïve” attributed to a stem cell means that this cell is truly pluripotent without any bias to a particular type of differentiation. The term “totipotent” corresponds to the capacity of the cells of the very early mammalian embryo to yield an entire new organism comprising not only all the cell types of the body, but also those forming the placenta. Pluripotent stem cells do not have this ability.

sidered to be ES cells are now thought to represent a later phase of development already “primed” (not naïve) for specific differentiation (the epiblast stage). Many scientists believe that this priming may explain why human “ES” cells behave inconsistently, presenting a major barrier to biomedical application.

In 2006, the knowledge that researchers gained from studying human ES cells was used to take differentiated cells of an adult tissue and reprogram them into pluripotent cells called “iPS cells” (induced pluripotent stem cells). By this time, scientists had discovered 4 genes that are normally expressed as a group only in ES cells **and not in adult tissue stem cells**. By switching on these 4 genes in adult cells, iPS cells were produced. iPS cells do not behave exactly like ES cells, but they are more closely related to ES cells than adult stem cells. Studying how iPS and other types of stem cells differ will be crucial for understanding human naïve, or ground state, pluripotency.

**Truly pluripotent stem cells will have added utility in developing new medical therapies, both directly by cell replacement and by providing model systems to study disease and test pharmaceuticals. More broadly, ground state pluripotency is the current scientific frontier.**

### **ES and iPS cells are fundamentally different in origin**

There is a critical difference between the origin, nature and fate of iPS versus ES cells. ES cells are derived from pre-implantation blastocysts, which is ethically challenging for the Doctrine of the Church and for a number of people. On the other hand, iPS cells are not derived from any stage of embryonic or fetal development. On the contrary, they derive from a non-pluripotent cell – typically an adult somatic cell – by inducing a “forced” expression of specific genes. They are extremely promising in the development of adult tissue stem cells, which are the goal of regenerative medicine. It is therefore a new gift of science to provide iPS cells which have never come from an embryo or fetus or oocyte.

Another recent advance is the reprogramming of one adult cell type to another, neither of which are stem cells, or pluripotent. The study of the cell type conversion is at the leading edge of a branch of science that helps us understand the generation and the complexity of cell types in the body.

### **Characteristics and potential of iPS cells**

Mouse embryonic cells can mature in petri dishes through recognizable stages, similar to those made by the implanted embryo during normal development. It is the hope that by extrapolation, human iPS cells will allow us to study in petri dishes many of the first steps in the devel-

opment of human tissue stem cells, the only cells useful for regeneration of human tissues and organs. Regrettably, classical methods to isolate adult tissue stem cells to date are only available for a few adult human tissue stem cells that can partially regenerate their respective tissues – blood, muscle, skin, and ocular surface.

Almost every interested laboratory can now try to identify and isolate tissue stem cells derived from iPS cells, so their wide use should accelerate the field.

In turn, this knowledge may be useful for culturing other types of adult stem cells. The ultimate goal is that one day, human tissues and organs might be regenerated from stem cells grown in culture. This has already been accomplished for the stem cells of the skin and the eye, where successful treatments for burn patients and some types of blindness have been developed and are in practice throughout the world.

However, adult somatic stem cells have limitations and only in a few organs it might be possible to directly derive all the cell types required for regeneration. For example, in the case of the adult brain, it is becoming increasingly clear that adult and even fetal, brain stem cells are highly specialized for the production of very specific sets of nerve and glial cells. iPS cell technologies are allowing an increasing number of laboratories to derive the specific types of nerve cells that could be used for regenerative medicine or to better understand the diseases.

Induced pluripotent stem cells today can be made from almost any normal tissue cells; they can mature to make tissue stem cells and mature tissue cells derived from them. In the iPS procedure adult cells [e.g. skin or limbus] can be reprogrammed back to the pluripotent state, as a cell line that is easy to grow and maintain in culture. Now the reprogramming is done by inserting into the cell's chromosomes a few reprogramming genes. In the recent past, in mice, reprogramming was achieved by replacing the nucleus of an unfertilized mouse oocyte with an adult mouse cell nucleus. The gene transfer method of reprogramming has taken hold and is being used by laboratories around the world to improve the technology and understand the underlying mechanism.

As abovementioned, iPS cells are not derived directly from fertilized eggs, and do not derive from a blastocyst, yet they have the great advantage of possessing a ground state which appears similar to that of early embryonic pluripotent cells which are the “gold standard” for pluripotency. However, it is absolutely critical that these iPS cells are truly at the ground state, and much current research is directed towards this goal. If this is accomplished, iPS cells might have the ability to make tissue stem cells that could be useful for regenerative medicine.

As importantly, iPS cells capture the genetics of the donor cells, which, for example, could carry a genetically determined untreatable disease. The capture of the cells with the altered genes that cause the disease offers an unprecedented opportunity to study the development of the human disease in a dish, or in the context of a mouse body when the tissue stem cells derived from the iPS cells are transplanted into the organ of a mouse representative of the tissue.

Finally, iPS cells from a person could one day be the repository of tissue stem cells from that person, when disease or accident necessitates tissue specific stem cell therapies; such cells could be a match for the patient.

iPS cell technology is not without shortcomings, though. Despite improvements in reprogramming strategies, the introduction of foreign DNA into differentiated adult cells carries the risk of insertional mutagenesis that can be at the origin of cell transformation into tumoral phenotypes. Even though reprogramming can now be achieved without inserting new genetic material into the recipient cells, concerns linger that the “memory” of the original cell may persist, limiting its prospective applications. Still more worrisome are the recent observations that the reprogramming process itself may be accompanied (if not even caused) by the induction and subsequent selection of genetic mutations associated to the reactivation of cell cycle genes, which may be incomplete. Moreover, the adult transformed cells, although rejuvenated to an embryonic stage, still keep their genomic age, with accompanying mutations. It is because of these concerns that we must carefully monitor the state of the art before rushing a fairly new and untested technology to clinical trials.

## EXAMPLES OF ADULT TISSUE STEM CELLS

### **Epidermal stem cells**

Epidermal stem cells from skin were the first adult human stem cells to be cultured under conditions where they could be maintained without losing their tissue regenerative potential. They were cultured in 1975, and by the late 1970s researchers were already applying these cultured stem cells for the successful treatment of badly burned patients. Today, thousands of burn victims worldwide have been saved due to this therapy using stem cells. In the 1980s, the methods used to culture epidermal stem cells were adapted to develop culture technologies for pluripotent stem cells, which eventually led to the development of iPS cells. Additionally, these methods were modified for culturing corneal



stem cells for the treatment of patients suffering from blindness due to industrial accidents. Just in the past two years, a report was published following 100 patients whose blindness was successfully cured using corneal stem cell therapy.

### **Blood forming stem cells**

Blood forming stem cells [HSC] are among the best studied of the adult, or tissue stem cells. Mouse HSC were first isolated in 1988, and human HSC in 1992. At the single cell level these cells both self renew and give rise to all blood cells. Pure, cancer free human HSC isolated from patients with metastatic cancer such as stage IV breast cancer can be frozen while the patient receives supralethal doses of combination chemotherapy, with the intent to kill most, if not all cancer cells in the body. Then the patients can be rescued with cancer free HSC, resulting [in a Stanford trial] in 33% survival at 13-15 years, whereas those patients rescued with their own unpurified mobilized blood, ~ 40% of the samples being contaminated with breast cancer cells, only had 7% overall survival. This first use of purified adult human stem cells can now be applied to a number of cancers.

Transplantation of blood forming tissues into irradiated or chemotherapy conditioned hosts leads to potentially lethal immune reactions by the donor T cells against all tissues of the host in a graft vs host response [GvH]. Pure HSC cannot cause GvH, and when engrafted in unrelated hosts, make blood cells and T cells in that host that tolerate tissue or organ grafts from the HSC donor or the host strain, but not from unrelated 3d parties; because HSC self-renew, this is a single treatment that maintains tolerance for life.

This establishes another use of pure HSC transplants: GvH free replacement of defective blood systems [e.g., SCID, sickle cell anemia, thalassemia], and induction of transplant tolerance of other, perhaps lost tissues by transplantation. This paradigm shows that human HSC transplantation for post chemoradiation injury, for inductions of transplantation tolerance, and for cure of genetic and acquired diseases of the blood has immediate applications. For now, the HSC donors are people. Perhaps in the future pluripotent stem cell lines [iPS] will provide adult type HSC and other tissue stem cells.

### **Stem cells of the gut epithelium**

The stem cells that renew the epithelium lining of the gut every 5 days were discovered many decades ago. They have recently been characterized and can now be cultured in vitro. Single intestinal epithelial

cells of the gut can produce in culture “mini guts” in which all the differentiated cell types of the gut epithelium can be recognized (for more information see the second part of this report).

### **Neural stem cells**

Although it was long considered that there was no production of new neurons in the brain of mammals in postnatal life, the last decades witnessed the discovery of active neural stem cells in the brain. It was shown that adult neurogenesis takes place normally in certain areas of the brain of mammals. The use of neural stem cells is envisioned to treat certain types of neurodegenerative diseases.

Prospectively isolated fetal human CNS stem cells can engraft in the brains of immune deficient [ID] mice, where they self-renew for life in the subventricular zone [SVZ] of the lateral ventricles and the dentate gyrus of the hippocampus; they migrate appropriately [taking the routes of progeny of mouse CNS SC], and they give rise particularly to oligodendrocytes in a site appropriate manner.

These human CNS SC (HCNS SC) can myelinate ID Shiverer mice by donor CNS-SC derived oligodendrocytes; and clinical trials in patients with Pelizaeus Merzbacher disease show myelination from the CNS SC transplants.

HCNS SC engraft, migrate and produce and secrete a missing enzyme in ID mice with human Batten Disease, and these enzymes block the neurodegeneration in the mice; patients with late stage Batten Disease have been transplanted with no treatment related adverse events. ID mice given a contusion injury at the 10th thoracic vertebra are paralyzed, but the paralysis tends to reverse by hCNS SC which produce migrating interneurons and especially myelinating oligodendrocytes; killing these mature human neural cells causes rapid demyelination and return to paralysis; 3 patients with thoracic spinal cord injury are now weeks to months out from transplantation with these same lots of hCNS SC. Therefore, prospective isolation of human CNS SC has allowed preclinical testing of their ability to treat diseases in which the cells are now used in patients.

### **Inappropriate uses of the term “stem cell”**

Several studies have shown that HSC make blood, and only blood. This is true also of HSC from human umbilical cord blood, and from whole umbilical cord blood as well, which therefore cannot be a source of pluripotent stem cells. Neither do mesenchymal stromal cells, misnamed mesenchymal stem cells, give rise to any tissue regeneration,

although it has been shown they have a very temporary anti-inflammatory action in the tissues they enter. Therefore, apart from at the early embryonic stage, pluripotent stem cells do not exist in the organism. **Nor do the so-called very small embryonic like stem cells [VSEL] give rise to blood or other tissues when tested in vitro and in vivo – they are mainly fragments with  $<2n$  amount of DNA, and the small cells can be contaminated with authentic large CD45+ HSC, which apparently accounts for their hematopoietic activity.**

**Taken together, we cannot find any somatic pluripotent cells in born mice or humans, and all stem cells are restricted to regenerate cell types within the tissue type they come from.**

It is surprising that 24 years after the first isolation of a tissue stem cell, only blood, brain, skin, cornea, mouse muscle, mouse intestine, and mouse osteochondral stem cells have been prepared in pure, prospectively isolatable forms. It is an urgent need to find alternative mouse and human tissue and organ stem cells to test their roles in regenerative medicine, whether these cells are first found in human tissues or derived from induced pluripotent stem cells.

### **The evolutionary origin of stem cells**

The extraordinary proliferative power of stem cells is particularly well illustrated in certain organisms. For example, plants like Azorella in the high plans of the Andes or Sequoias in the Pacific Northwest of the United States, grow and live for thousands of years because their stem cells in the apical roots and meristems continuously produce the progeny necessary for the production of the differentiated tissues found in the organism's anatomy.

Animals like Planaria contain in their body pluripotent stem cells able to renew constantly the differentiated cells of their organs after they disappear by natural cell death (apoptosis). These stem cells even confer to these complex organisms the capacity to reproduce asexually by scissiparity indefinitely. Stem cells, therefore, have a major role in cellular homeostasis of virtually all multicellular organisms and the molecules associated with regulating cell division and proliferation are evolutionarily ancient molecules dating back to the emergence of plants and metazoans. Interestingly, many of these molecules, active in stem cells, are known to be associated with cancer. Yet, because many of these molecules are found in single-celled organisms, it is unlikely that they evolved to cause cancer. Instead they are likely to have evolved to sense changes in the environment to allow cells to proliferate in response to injury and/or physiological wear and tear.

**Given the multiple known functions of stem cells, it stands to reason that an equally numerous number of unknown functions and biology remains to be discovered. Hence, it seems appropriate that if we wish to truly understand stem cells and their remarkable embryonic and adult biology, and to be able to use them in medicine, more doors must be opened to scientific investigation of the new iPS cells, about which a lot still remains to be understood.**

**The unity and diversity of stem cells, and the era of regenerative medicine.**

The predecessor of this workshop of the Academy was held in 2003. Since then a number of scientific and funding advances have accelerated nearly all aspects of stem cell research at an astonishing rate. Scientists around the world are moving to various stem cells as the preferred target to understand the basic science of cells, differentiation and disease for a variety of tissues and using a variety of species. Early translation of pure stem cell therapies have now matured to highly significant advances in the treatment of some diseases, such as metastatic breast cancer. Brain stem cells are transplanted experimentally in animals to discover their mysteries in self-renewal, migration, differentiation, and function; and many clinical trials using human brain stem cells for otherwise incurable diseases are in progress or being planned. These trials are overseen at each institution by independent review boards with the power to guide, change, and even stop the human studies. Some preliminary toxicity studies are moving to later phase trials where efficacy can be determined, all under the guidance of national regulatory agencies such as the FDA (Food and Drug Administration) and EMA (European Medicines Agency). On the other hand, some culture system like skin (under clinical use from 1984) and cornea (under clinical use from 1997) are already well established.

In 2003 the only likely method to create pluripotent stem cell lines from predesignated individuals, capturing the genetics of their health and diseases in cell lines capable of producing most, if not all cell types in the body, was by the cumbersome method of somatic cell nuclear transfer into oocytes from the same species, with no success then or now using human cells. The remarkable finding by Yamanaka et al that pluripotency genes could be transferred to almost any ordinary body cell and reprogram it, has made the field of induced pluripotent stem [iPS] cell biology open to all qualified investigators, including those who would not work with tissues derived from embryos or fetuses. This has broadened the research not only to all investigators, but also producing pluripotent stem cells of all kinds of humans, whether rich or poor, of

one or another ethnic group, or even from people with simple or complex genetic predilections for disease, and even the diseases themselves. Notably, the iPS are still not without risk of cancer and directing these pluripotent cells toward a stable differentiated state remains a challenge that scientists worldwide are actively working to address.

It was therefore highly timely to hold this workshop so that stem cell scientists of the highest levels of accomplishments and clinical translationists pioneering the field of regenerative medicine, and even cancer stem cell biologists and physicians could present and discuss their advances in the field. However, hanging as a pall over these efforts are the misguided, or mistaken, or even frankly fraudulent emergence of 'stem cell therapies'. Collectively, these are commercializations, frequently highly profitable, that lack the science to expect success, lack the oversight of IRBs to guarantee safety, and regulatory agencies to oversee and certify ethics, safety and efficacy. Some of these stem cell therapies do not even use stem cells that can regenerate tissue, or others that are not even cells at all. A few have sought and received the support of some of the most important and influential institutions in modern society. The workshop has alerted the Academy and its parent institution, the Vatican, of these dangerous elements.

Nevertheless, the overall picture is of a field, that like an express superspeed train has not only left the station, but is accelerating toward warp speed in its advances in science and in medicine. We hope these comments will stimulate useful and enlightened discussion at the fall meeting of the Council.

Signed by: WERNER ARBER, NICOLE LE DOUARIN, ALEJANDRO SÁNCHEZ ALVARADO, HANS CLEVERS, IRVING WEISSMAN, RUDOLF JAENISCH, AUSTIN SMITH, HELEN BLAU, ELAINE FUCHS, ARTURO ALVAREZ-BUYLLA, GIULIO COSSU, GRAZIELLA PELLEGRINI, ANGELO VESCOVI, VANIA BROCCOLI, CAMILLO RICORDI, RAFAEL VICUÑA.

## SEVERAL REPORTS CONCERNED STUDIES ON TISSUE-SPECIFIC ADULT STEM CELLS AND SHOWED THE STATE OF THE ART IN THIS FIELD AND THE INTEREST OF THESE CELLS IN REGENERATIVE THERAPY

### *Novel avenues of research that can lead to regenerative therapies via cell based regenerative medicine: Helen Blau*

The mechanisms that lead to iPS are not well understood and as a result the generation of these pluripotent cells is very infrequent (<1/1,000) and take a long and variable time to generate (2-3 weeks). Helen Blau proposed using her heterokaryon system in which mouse ES cells are fused with human fibroblasts (3:1 ratio). This induces activation of the human pluripotency at a frequency of 70%, synchronously, within hours and has enormous potential in this respect. By identifying the earliest genes activated and then pursuing loss of function studies in fibroblasts exposed to the 4 Yamanaka factors, the regulatory mechanism required to initiate the process can be induced, leading to a more efficacious, high efficiency generation of iPS with greater fidelity. She also proposed that much more attention needs to be devoted to shutting down the pluripotency and inducing a truly differentiated and non-neoplastic state for diverse cell types.

Much can be learned from regenerative organisms such as newts, which can regenerate their hearts and limbs. These organisms, like planaria (according to Alejandro Sanchez Alvarado) inactivate a tumor suppressor (in the case of newts, Rb) transiently in order to allow well-differentiated cell types of known identity (post-mitotic organs) to re-enter the cell cycle and make copies of themselves. This approach may have a much lower chance for neoplasia than iPS or ES. Dr. Blau demonstrated that this can now be achieved in mammalian cells, by inactivating transiently two tumor suppressors, Rb and p19. Notably, p19 first arose in chickens and does not exist in newts. When both of the tumor suppressors are transiently inactivated by siRNAs the cells can generate millions of cells of known identity. As proof of principle, Dr. Blau showed that postmitotic skeletal muscle cells can generate numerous determined progenitors that function to regenerate damaged skeletal muscle in vivo after transplantation into mice.

Dr. Blau discussed the role of telomeres in stem cell therapies. Telomere reserve is critical to the regeneration of damaged tissues, as she showed in the case of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). In DMD, the heritable absence of a key contractile protein dystrophin in conjunction with short telomeres leads to an inadequate stem cell reserve for the regeneration of muscle that is under chronic stress to repair damage. As a result, the cells fail and children are wheelchair bound and pulmonary function is impaired leading to premature death in the third decade of life. As a result of her work in which she generated mice that lack dystrophin and have short telomeres, we now have a better understanding of the etiology of the disease and can design more efficacious and novel therapies.

Adult stem cells exist in certain tissues, such as skeletal muscle. When freshly isolated, these cells have remarkable regenerative capacity. However, their use is hindered by the inability to expand the cells in culture and expansion for therapeutic applications. Dr. Blau showed that soft hydrogels with an elasticity comparable to skeletal muscle tissue can maintain stem cell properties that are rapidly lost on stiff plastic culture dishes. Once maintained, small molecules or proteins can be screened and identified that are capable of expanding and even rejuvenating such adult tissue specific stem cells, even from old individuals. These 4 sources of stem cells for regeneration warrant further study and exploration and different solutions will be optimal for different tissues and diseases.

### ***Epidermal stem cells: Elaine Fuchs***

Before the methods were developed to identify and isolate stem cells from organized tissues, Howard Green developed methods to culture human skin cells; the cultures contained skin stem cells, so the biology and therapeutic translations of the biology could go forward. His applications led to modern treatment of burn patients with cultured epidermal sheets, whose stem cells allowed lifelong retention of the skin grafts by the patients. Elaine Fuchs has used the mouse as a model for skin and hair stem cell biology. This has allowed her to find the kinds of expressed genes that allow stem cells to self-renew – the central property of stem cells – as well as make skin, hair, and the associated sweat and sebaceous glands. Once these genes are understood and their targets known, it is conceivable that small molecule or protein therapeutics will be useful for treatment of degenerative skin conditions. This example of adult stem cell biology has direct application to the understanding of a

plethora of human skin conditions, including the development of skin cancers. So far, the developing and developed cancer cells from the mouse model have the markers and behavior of human skin cancers, including the lack of response to proliferation inhibitory signals by the cells in skin that provide a regulating stroma.

***Finding and isolating endodermal tissue derived stem cells: Hans Clevers***

Hans Clevers spoke about his recent research on adult stem cells in the epithelium of the intestinal tract. The intestinal epithelial cells have a life cycle of around 5 days after they are produced from an intestinal stem cell. It is thus the most rapidly self-renewing tissue of the mammalian body. Several years ago, Clevers and Barker reported a novel surface receptor, *Lgr5*, that marks small proliferative cells in the small intestine, as well as in multiple other organs. They subsequently showed that these *Lgr5* cells indeed represent the long-lived, multipotent stem cell of the small intestine and colon. Further work has revealed that *Lgr5* appears to be a rather universal marker of stem cells in multiple organs, both during self-renewal and in tissue repair upon injury. These additional organs include pancreas, liver, skin and stomach.

*Lgr5* serves as the receptor of a previously poorly characterized stem cell growth factor, termed *Rspondin*. *Rspondin/Lgr5* interactions potently enhance the strength of Wnt signals. Such Wnt signals have long been known to be crucial for the activity of multiple adult stem cell types. The Clevers lab has taken advantage of the *Rspondin/Lgr5* system to develop a 3D-culture system, based on Matrigel and a small set of defined growth factors, always including *Rspondin*. In this culture system, *Lgr5* stem cells from multiple organs, both from adult mouse and man, can be expanded over long periods of time, while retaining tissue identity and an intact genome. Indeed, multiple mice with an injured colon could be transplanted with cells that were grown from a single adult colon stem cell. Even after 6 months, the transplanted tissue remained and functioned normally. In vitro expansion and transplantation protocols for other tissues are being developed. These developments have the promise that patients can be treated by taking small biopsies (either from the patient or from a matched donor) from the organ to be repaired, expanding the resident *Lgr5* stem cells in culture, after which the healthy cells can be transplanted to repair the diseased organ.

***Neural stem cell therapies: Arturo Alvarez Buyla, Oliver Brüstle, Angelo Vescovi***

Neurodegenerative diseases frequently result from the death of nerve cells (neurons). For many years, neuronal replacement was considered



impossible, but this view began to change with the discovery of adult neurogenesis. Neural replacement is possible for certain types of neurons in fully developed brains. This process occurs naturally in certain brain regions, but the stem cells that serve as the primary progenitors *in vivo* are regionally specified. Work in rodents has shown that endogenous adult neurogenesis in the walls of the cerebral ventricles (the largest adult neurogenic germinal zone) is not directed towards brain repair, but instead, it is part of a constant process of neural plasticity. In the human brain, neurogenesis occurs robustly in the walls of the lateral ventricle the first year of life, but this process is greatly reduced in older children or in adults. Recent work from the laboratory of Alvarez Buylla has shown that adult neural stem cells are highly specified. Just like in the embryo, their location within the adult germinal niche determines the types of neurons these primary progenitors generate. Therapeutic neuronal replacement may be possible in regions of the brain where new neurons are normally not added, but this likely requires specific progenitor cells only found during specific periods of embryonic development and in restricted locations. Timing in development and locations are key for the production of the wide range of neuronal cell types present in the adult brains. Mimicking what normally happens in the adult olfactory bulb, where local inhibitory interneurons are continually added throughout adulthood, the laboratory of Alvarez Buylla has developed new methods to add inhibitory local interneurons to striatum and cortex. The source of these cells is the developing medial ganglionic eminence (MGE). Grafts of these fetal cells have proven effective in animal models of epilepsy and Parkinson's. Transplantation of MGE cells can also induce a new period of neural plasticity in visual cortex. This knowledge is essential for future production of precursor cells from adult progenitors, iPS cells for brain repair.

Also regarding neural stem cells, the laboratory of Oliver Brüstle has established methods for the derivation of long-term self-renewing neuroepithelial stem (Lt-NES) cells from human embryonic stem cells (hESC) and induced pluripotent stem cells (iPSC). Lt-NES represent a stable, rosette-forming population still amenable to regional patterning. A detailed comparison between various hESC and iPSC-derived Lt-NES cells revealed that Lt-NES show remarkable similarities and may thus represent a 'standard' neural stem cell population particularly suited for comparative studies of disease-derived neural cells and controls. That they may be derived either from ES cells and from iPSC cells allows more inclusive groups of investigators to work with these important kinds of stem cells. Thus, neurons generated from Lt-NES cells express the entire array of Alzheimer's disease (AD)

associated human proteins and exhibit functional amyloidogenic protein processing as well as endogenous phosphorylation of the various tau isoforms found in the adult human brain. Genetic modification of both APP and tau processing can be used to experimentally assess the potential impact of AD-related variants of these proteins on neuronal homeostasis.

Results from this group indicate that developmentally early hESC and iPSC-derived neurons provide a unique window of opportunity for studying pathogenic driver mechanisms underlying age-related neurodegenerative diseases in a pre-symptomatic phase preceding neuronal degeneration.

These approaches might be complemented by the direct generation of induced neurons (iN) via transcription factor-based cell conversion from fibroblasts and other somatic cell types. Their most recent data suggest that functional neuron-like cells, which should be suitable for the direct generation of bulk quantities of human induced neurons (iNs) for biomedical applications, can be obtained by the overexpression of only two neurogenic transcription factors.

Data were presented by Vescovi that show that in many pathological contexts, including brain ischemia, spinal cord injury, autoimmune diseases and ALS models, the systemic or local implantation of the GMP-grade human neural stem cells can elicit multifaceted therapeutic effects, often by dampening astrogliosis and microgliosis.

Based on preclinical evidence and GMP cell certification, a group has received approval from the Istituto Superiore di Sanità to proceed with a clinical Phase I trial on 18 patients affected by ALS, to be carried out by transplantation of said cells in the ventral spinal cord in 3 groups of patients that will receive injections into the lumbar (group 1) or cervical (group 2 and 3), in the reason of a range of 2.2 to 4.4 total million human neural stem cells.

The first two patients will be transplanted on June 2012, in the hospital Santa Maria, in the city of Terni, in the Umbria province. The selection of patients has started in December 2011 and is continuing.

### ***Other adult stem cells for therapies: Giulio Cossu***

Mesoangioblasts are vessel-associated progenitor cells that led to a functional amelioration upon transplantation in dystrophic mice and dogs. Cossu reported the results of a phase I/II trial of cell therapy for Duchenne Muscular Dystrophy based upon successive intra-arterial transplantations of donor mesoangioblasts from an HLA-identical donor. Safety was the primary objective of the study. A possible increase in muscle strength as a consequence of mesoangioblast transplantation is also being evaluated.

### ***Multidisciplinary approaches to a stem cell therapy in the case of Diabetes mellitus: Camillo Ricordi***

Diabetes Mellitus (DM) represents a global epidemic affecting over 350 Million patients worldwide and projected by the WHO to surpass the 500 million patient mark within the next two decades. The most severe forms of DM are generally linked to the Type 1 variant (T1DM). In these cases, total or near-total destruction of insulin producing cells (the beta cells contained in the pancreatic islets – *Islets of Langerhans*) occurs. The objectives of cellular therapies and regenerative medicine strategies for treatment of DM are to reverse the disease condition and prevent the development of the severe chronic complications that can affect most organ systems in most patients. In T1DM, the additional challenge of the underlying autoimmune condition imposes consideration of strategies that would restore self-tolerance or abrogate the effects of autoimmunity, so that the immune system can no longer destroy the new insulin producing cells introduced either by regenerating, reprogramming or replacement (e.g., transplantation of pancreatic islets or stem cell derived insulin producing cells). Abrogation of autoimmunity could be achieved by transplantation of HSC from diabetes resistant matched donors [see Weissman section below] or immune protection (e.g., engineered microenvironment or selective permeability physical barriers like those introduced by micro-, conformal- or nano-encapsulation). Any therapeutic strategy, to be considered must avoid side effects such as those associated with life-long immunosuppression, which now limits the indications of adult islet transplantation to the most severe cases of T1DM. There is a broad consensus on the idea that stem cells will replace islets in the near future.

Earlier this decade, Ferber and colleagues pioneered this approach by delivering the Pdx1 gene (a vital regulator of pancreatic development and beta cell homeostasis) into recipient mice by means of adenoviral vehicles. Ectopic expression in the liver led to the activation of beta cell genes and dramatic reductions in blood glucose levels, which outlived the period during which the adenovirus was expected to remain in the system. Other groups reported similar results either with Pdx1 alone or together with other reprogramming genes, including Doug Melton group at Harvard, which recently reported that the transfer of three factors (Pdx1, Ngn3 and MafA) led to the reprogramming of pancreatic acinar tissue towards beta cells.

In conclusion the selection of the most appropriate source for insulin producing cells is still not defined and the selected alternatives between

replacement, reprogramming and regeneration strategies should be further developed in pre-clinical model systems and tested in pilot clinical trials while carefully assessing cost-effectiveness and the relative potential for scale up, to offer a realistic therapeutic option for most patients affected by diabetes. Careful attention should be also directed to assessment of the risks/benefit ratio associated with the selected cell product, regenerative or reprogramming strategy.

***Regenerative Medicine and ocular surface: toward the light. Graziella Pellegrini***

The only cultured cell types extensively used for tissue regeneration are human adult keratinocyte and the chondrocyte. Cultured autologous keratinocyte derived from the epidermis have been used for many years to produce grafts that regenerate an epidermis over a full thickness wound, such as a third-degree burn. Advances in graft preparation, combining better preservation of stem cells with ease of application of the graft have been applied to cultures of ocular corneal stem cells.

Autologous corneal stem cells have been cultivated on fibrin to treat 112 patients with corneal damage, most of whom had burn-dependent limbal stem-cell deficiency and related blindness. Published clinical results have shown permanent restoration of a transparent, renewing corneal epithelium in 76.6% of eyes. Restored eyes remained stable over time, with up to 10 years of follow-up. In post hoc analyses, success – the generation of normal epithelium on donor stroma – was associated with the percentage of p63-bright holoclone-forming stem cells in culture. Cultures in which those p63-bright cells constituted more than 3% of the total number of clonogenic cells were associated with successful transplantation in 78% of patients. In contrast, cultures in which such cells made up 3% or less of the total number of cells were associated with successful transplantation in only 11% of patients. Many groups all over the world reproduced a successful treatment of limbal stem cell deficiency-related blindness in small groups of patients. Cultures of limbal stem cells represent a source of cells for transplantation in the treatment of destruction of the human cornea due to burns. The procedure has been highly successful in the alleviation of suffering and the restoration of vision.

***Stem cells and cancer: Irv Weissman***

The idea that cancer progression might involve cancer stem cells has been developed by Dr Irving Weissman on the basis of the type of leukemia described below. The progression from normal cells to cancer cells involves a large number of genetic and epigenetic events, each of

which is rare. Because during hematopoiesis only the rare [ $\sim 1/15,000$  cells] HSC self renew for life, we proposed that the progression from normal to leukemic cells likely occurs in unique HSC clones. The mutations and epigenetic changes that occur in the downstream progeny, unless they confer self-renewal, will be lost with the natural lifespan of the cell.

That explains why the bcr-abl translocation occurs often, but only rarely does it 'fix' in the patient to cause the chronic phase of CML. The hypothesis is correct: the progression occurs in subclones of HSC, but the acute leukemia emerges with these changes at the level of multipotent progenitors [AML] or granulocyte monocyte progenitors [blast crisis of CML]. The daughter blast cells from these leukemia stem cells are not malignant. Gene expression comparisons of mouse LSC and human LSC vs the normal counterparts have revealed a common upregulation of expression of a cell surface protein, CD47. The CD47 molecule is a 'don't eat me' signal for macrophages that counters the surface 'eat me signals' that are induced with the malignancy mutations and epigenetic changes. Blocking antibodies to CD47 allows their removal by macrophages. CD47 is a constant change in all tested human cancers, and all of them can be shrunk or eliminated, and their metastases eliminated, with the anti CD47 blocking antibodies. Therefore the extension of the adult stem cell concepts to the prospective isolation of cancer stem cells, and the evaluation of their gene expression profiles, has immediately paid off with the first anti-cancer product, currently only in pre-clinical trials, that treats all human cancers.

## PREFAZIONE

Siamo molto lieti di presentare lo Statement del Workshop intitolato *Nuovi sviluppi della ricerca sulle cellule staminali: le cellule staminali pluripotenti indotte e le loro possibili applicazioni in medicina*. Come affermato dallo stesso titolo, lo scopo del Workshop era quello di studiare le cellule iPS (staminali pluripotenti indotte). Le cellule iPS, come definito nel seguente Statement, non derivano da nessuno stadio di sviluppo embrionale o fetale. Al contrario, esse derivano da una cellula non-pluripotente – tipicamente una cellula somatica adulta – nella quale viene indotta l'espressione “forzata” di geni specifici. Queste cellule sono estremamente promettenti per lo sviluppo delle cellule staminali tissutali adulte, che costituiscono l'obiettivo della medicina rigenerativa. È quindi un nuovo dono della scienza quello di fornire cellule iPS che non sono mai derivate da un embrione o da un feto o da ovocita ma che sono, tuttavia, pluripotenti e quindi analoghe alle cellule staminali embrionali in una certa fase. Le cellule staminali embrionali, che non facevano parte dell'argomento di questo workshop, sono menzionate nel presente Statement solo in relazione alle cellule iPS. Aristotele dice che “la conoscenza dell'atto precede la conoscenza della potenza” (*Metafisica IX, 9, 1049 b 16*) e Gesù Cristo dice che “ogni albero si riconosce dal suo frutto” (*Lc 6:44*). Pertanto, poiché le cellule iPS non possono, di per sé, generare un essere umano o un clone, il loro uso non sembra contrario all'antropologia biblica insegnata dalla Chiesa, la quale ritiene che, a differenza di altri viventi della natura, ogni essere umano, a partire dall'inizio del suo concepimento, “è la sola creatura in terra che Iddio abbia voluto per se stesso” (*Gaudium et Spes 24*). Nel ringraziare il nostro eccezionale gruppo di scienziati per l'importante collaborazione e il duro lavoro svolto, e soprattutto la Professoressa Nicole Le Douarin per la sua straordinaria leadership e competenza, vorremmo sottolineare che le opinioni espresse nel presente Statement, con assoluta libertà da parte degli scienziati presenti al nostro workshop, rappresentano esclusivamente i loro punti di vista e non quelli dell'Accademia.

S.EM. GEORGES M.M. CARDINAL COTTIER O.P.  
S.E. MONS. MARCELO SÁNCHEZ SORONDO

## DICHIARAZIONE

### Considerazioni introduttive

Il workshop è stato incentrato sulla tecnologia di recente sviluppo che ha permesso la produzione delle cosiddette “cellule staminali pluripotenti indotte” (o cellule iPS), le quali rappresentano una speranza seria per la nascita di una vera medicina rigenerativa.

Questo notevole successo nel campo delle biotecnologie avanzate nasce dalle conoscenze acquisite grazie alla ricerca sulle prime fasi di sviluppo dei mammiferi e sulla possibilità di fissare in coltura e perpetuare indefinitamente uno stato di pluripotenza delle cellule presenti nell’embrione prima del suo impianto nell’utero materno. Le cellule derivanti da questa tecnica sono state designate “cellule ES” (cellule staminali embrionali). Esse sono il punto di partenza delle attuali cellule iPS.

Lo Statement è diviso in due parti: la prima riguarda le considerazioni generali sulle cellule iPS, ricavate dai contributi di tutti i partecipanti; la seconda parte contiene contributi aggiuntivi non trattati per esteso nella prima parte.

### Scoperta, caratteristiche e applicazioni delle cellule iPS

La sopravvivenza degli organismi multicellulari, dalle piante agli animali, dipende dall’attività biologica delle **cellule staminali**. All’interno di ogni organo o tessuto nei vertebrati, le cellule staminali sono le uniche cellule che, nel corso di tutta la vita, creano i tessuti e riparano le ferite. Durante la nostra vita, queste cellule molto particolari e spesso rare all’interno di ogni organo del nostro corpo possono dividersi e produrre cellule mature del tessuto a sostituzione di quelle morte o danneggiate. Sorprendentemente, al tempo stesso, alcune cellule staminali figlie, grazie all’auto-rinnovamento, permangono allo stato di cellule staminali facendo sì che la riserva di queste generatrici originarie di tessuto rimanga costante. Spesso, durante la creazione di una cellula matura, le cellule staminali genereranno inizialmente una cellula “dedicata” di breve durata, che si dividerà rapidamente prima della maturazione. Ad esempio, le cellule staminali che formano il sangue si dividono per generare una cellula staminale figlia, mentre l’altra cellula figlia passa attraverso 20-30 divisio-

ni cellulari e ciascuna di queste figlie matura per creare una cellula ematica. In questo modo, una singola cellula staminale può generare da 1 milione a 1 miliardo di cellule ematiche di ogni tipo.

Quando vengono presi in considerazione tutti i tessuti del nostro corpo, ogni essere umano cambia tra i 50 e i 70 miliardi di cellule al giorno. In un anno un essere umano normale cambierà una massa cellulare equivalente al proprio peso corporeo. Data la speranza di vita in continua crescita, la quantità di cellule che dobbiamo ricostituire diventa enorme, anche in assenza di lesioni gravi. Ciò è possibile a causa delle funzioni biologiche delle cellule staminali residenti nei nostri tessuti (sangue, pelle, intestino, ecc). Ogni cellula staminale tissutale forma solo le cellule del suo tessuto, vale a dire, le cellule staminali del sangue producono solo il sangue, le cellule staminali della pelle producono solo le cellule della pelle, le cellule staminali intestinali producono solo le cellule dell'intestino, ecc.

La capacità dei tessuti adulti di auto-rinnovarsi è essenziale non solo per permettere al nostro corpo di sostituire le cellule perdute ogni giorno per cause naturali, ma anche per riparare i tessuti feriti. Alcuni tessuti come la pelle hanno cellule staminali che possono essere coltivate in laboratorio, e questo ha portato a terapie con cellule staminali che hanno permesso di salvare pazienti gravemente ustionati che avevano perso la maggior parte delle cellule staminali della loro pelle, coltivandone le poche rimanenti. Questa strategia è stata recentemente applicata con successo per ripristinare la vista di pazienti ciechi che, causa infortunio, avevano perso la maggior parte delle cellule staminali epiteliali corneali.

Anche se questi esempi dimostrano da tempo il successo nell'uso delle cellule staminali in medicina, la limitata capacità di formazione del tessuto da parte delle cellule staminali e la loro, spesso ridotta, concentrazione nel corpo limitano i tipi di terapie possibili con le cellule staminali adulte. Tuttavia, gli scienziati hanno recentemente sfondato questa barriera sfruttando le nostre conoscenze fondamentali dello sviluppo umano.

La pluripotenza – la capacità di generare tutti i tipi di cellule del corpo – è alla base dello sviluppo nei mammiferi. Prima che la blastocisti si impianti nell'utero, emerge un piccolo gruppo di cellule pluripotenti *naïve*.<sup>1</sup> Esse rimangono in uno stato *naïve* solo transitoriamente prima di iniziare a specializzarsi nei diversi lignaggi. Risale al 1981 la scoperta

<sup>1</sup> Si noti che il termine *naïve* attribuito a una cellula staminale significa che la cellula è veramente pluripotente senza pregiudizi nei confronti di un particolare tipo di differenziazione. Il termine "totipotente" corrisponde alla capacità delle cellule dell'embrione mammifero ai primi stadi di produrre un organismo intero e completamente nuovo comprendente non solo tutti i tipi di cellule del corpo, ma anche quelle che formano la placenta. Le cellule staminali pluripotenti non hanno questa capacità.



che questo piccolo gruppo di cellule pluripotenti poteva essere coltivato. Nella capsula di Petri le risultanti cellule staminali embrionali (ES) erano in grado di auto-rinnovarsi a tempo indeterminato, mantenendo il pieno potenziale di differenziazione e l'identità pluripotente. **Negli ultimi trent'anni, lo studio delle cellule staminali embrionali nei mammiferi ha rivelato particolari caratteristiche molecolari che sono alla base della pluripotenza.**

Questi studi hanno inoltre evidenziato profonde differenze tra le cellule staminali embrionali derivate da topi e quelle derivate da linee cellulari umane. Attualmente si crede che le cellule umane, che in origine venivano considerate cellule staminali embrionali, rappresentino invece una fase successiva di sviluppo già "innescato" (non *naïve*) a favore di una differenziazione specifica (la fase dell'epiblasto). Molti scienziati ritengono che questo innesco potrebbe spiegare il motivo per il quale le cellule staminali "embrionali" umane si comportino in modo incoerente, rappresentando un grave ostacolo per le applicazioni biomediche.

Nel 2006, le conoscenze che i ricercatori avevano ottenuto dallo studio delle cellule staminali embrionali umane sono state utilizzate per prendere le cellule differenziate di un tessuto adulto e riprogrammarle, facendole diventare cellule pluripotenti chiamate "cellule iPS" (cellule staminali pluripotenti indotte). A quell'epoca gli scienziati avevano scoperto quattro geni che sono normalmente espressi come gruppo solo nelle cellule staminali embrionali e **non nelle cellule staminali tissutali adulte**. Grazie all'attivazione di questi quattro geni nelle cellule adulte, si è arrivato a produrre le cellule iPS. Le cellule iPS non si comportano esattamente come le cellule staminali embrionali, ma sono più simili alle cellule staminali embrionali che alle cellule staminali adulte. Lo studio delle differenze tra cellule iPS e altri tipi di cellule staminali sarà di importanza cruciale per comprendere la pluripotenza umana *naïve* o allo stato fondamentale.

**Inoltre, le cellule staminali realmente pluripotenti saranno utili nello sviluppo di nuove terapie mediche, sia direttamente, tramite sostituzione cellulare, che fornendo sistemi modello per studiare le malattie e testare i prodotti farmaceutici. Più in generale, la pluripotenza allo stato fondamentale rappresenta l'attuale frontiera scientifica.**

**L'origine delle cellule staminali embrionali e delle cellule iPS è fondamentalmente diversa**

C'è una differenza fondamentale tra l'origine, la natura e il destino delle cellule iPS rispetto alle cellule staminali embrionali. Le cellule staminali embrionali derivano da blastocisti preimpianto, rappresentando

una sfida etica sia per la dottrina della Chiesa che per un certo numero di persone. Le cellule iPS, invece, non derivano da nessuno stadio dello sviluppo embrionale o fetale. Al contrario, esse derivano da una cellula non-pluripotente – tipicamente una cellula somatica adulta – in cui è stata indotta l'espressione "forzata" di geni specifici. Esse sono estremamente promettenti per lo sviluppo di cellule staminali adulte del tessuto, che costituiscono l'obiettivo della medicina rigenerativa. La possibilità di fornire cellule iPS che non sono mai derivate da un embrione o da un feto o da ovocita è perciò un nuovo dono della scienza.

Un altro progresso recente è la riprogrammazione di un tipo di cellula adulta per trasformarla in un altro tipo, nessuna delle quali è una cellula staminale o pluripotente. Lo studio della conversione del tipo di cellula è all'avanguardia di un ramo della scienza che ci aiuta a capire la generazione e la complessità dei tipi di cellule nel corpo.

### **Caratteristiche e potenziale delle cellule iPS**

Le cellule embrionali di topo possono maturare nelle capsule di Petri attraverso fasi riconoscibili, simili a quelle che avvengono nell'embrione impiantato durante lo sviluppo normale. Ci si auspica che, per estrapolazione, le cellule iPS umane ci permettano di studiare nelle capsule di Petri molti dei primi passi dello sviluppo delle cellule staminali tissutali umane, le uniche cellule utili alla rigenerazione di tessuti e organi umani. Purtroppo, ad oggi, i metodi classici per isolare le cellule staminali tissutali adulte sono disponibili solo per poche cellule staminali tissutali umane che sono in grado di rigenerare parzialmente i rispettivi tessuti: sangue, muscoli, pelle e superficie oculare.

Quasi tutti i laboratori interessati sono ora in grado di provare ad identificare e isolare le cellule staminali dei tessuti derivati da cellule iPS, perciò il loro largo impiego dovrebbe accelerare il campo.

A sua volta, questa conoscenza può essere utile per coltivare altri tipi di cellule staminali adulte. L'obiettivo finale è quello di rigenerare, un giorno, tessuti e organi umani da cellule staminali coltivate in laboratorio. Per le cellule staminali della pelle e dell'occhio questo è già realtà, essendo stati sviluppati e messi in pratica in tutto il mondo trattamenti efficaci per pazienti ustionati e per alcuni tipi di cecità.

Tuttavia, le cellule staminali somatiche adulte presentano delle limitazioni e potrebbe essere possibile solo per pochi organi derivare direttamente tutti i tipi di cellule necessarie per la rigenerazione. Ad esempio, nel caso del cervello adulto, è sempre più evidente che le cellule staminali adulte e persino fetali del cervello sono altamente specializzate nella produzione di insiemi molto specifici di cellule nervose e gliali. Le tecnologie basate sulle

cellule iPS stanno permettendo a un numero crescente di laboratori di derivare tipi specifici di cellule nervose che potrebbero essere utilizzati per la medicina rigenerativa o per comprendere meglio le malattie.

Oggi, le cellule staminali pluripotenti indotte possono essere create da quasi tutte le cellule dei tessuti normali; possono maturare per creare cellule staminali dei tessuti e le cellule mature del tessuto che ne derivano. Durante le procedure di iPS si possono riprogrammare le cellule adulte [ad esempio la pelle o il limbo corneale] riportandole allo stato pluripotente, come linea cellulare facile da coltivare e mantenere in coltura. Attualmente la riprogrammazione avviene inserendo, nei cromosomi della cellula, alcuni geni di riprogrammazione. In un passato recente, nei topi, la riprogrammazione si otteneva sostituendo il nucleo di un ovocita di topo non fecondato con un nucleo di cellula di topo adulto. Il metodo di riprogrammazione basato sul trasferimento genico ha preso piede ed è utilizzato dai laboratori di tutto il mondo per migliorare la tecnologia e comprenderne il meccanismo sottostante.

Com'è già stato detto, le cellule iPS non derivano direttamente né da uova fecondate né da blastocisti, eppure hanno il grande vantaggio di possedere uno stato fondamentale che appare simile a quello delle cellule embrionali pluripotenti ai primi stadi, che sono il "gold standard" della pluripotenza. Tuttavia, è assolutamente indispensabile che queste cellule iPS siano davvero allo stato fondamentale, e gran parte della ricerca attuale è orientata verso questo obiettivo. Se si arriva a questo, le cellule iPS potrebbero avere la capacità di creare cellule staminali tissutali che potrebbero essere utili per la medicina rigenerativa.

Altrettanto importante è il fatto che le cellule iPS catturano la genetica delle cellule del donatore, che potrebbe, ad esempio, essere portatore di una malattia genetica incurabile. La cattura delle cellule con i geni alterati che causano la malattia offre un'opportunità senza precedenti per studiare lo sviluppo della malattia umana in laboratorio, o nel contesto del corpo di un topo quando le cellule staminali del tessuto derivate dalle cellule iPS vengono trapiantate nell'organo di un topo che rappresenta quel tessuto.

Infine, le cellule iPS di una persona potrebbero un giorno diventare un deposito di cellule staminali tissutali di quella persona, quando per malattia o infortunio si rendano necessarie terapie con cellule staminali specifiche per un dato tessuto; tali cellule, infatti, potrebbero rappresentare una corrispondenza perfetta per il paziente.

Tuttavia, la tecnologia delle cellule iPS non è priva di difetti. Nonostante il miglioramento delle strategie di riprogrammazione, l'introduzione di DNA estraneo in cellule adulte differenziate comporta il

rischio di mutagenesi inserzionale che può essere all'origine della trasformazione delle cellule in fenotipi tumorali. Anche se, attualmente, la riprogrammazione può essere realizzata senza l'inserimento di nuovo materiale genetico nelle cellule riceventi, resta la preoccupazione che la "memoria" della cellula originaria possa persistere, limitando le sue potenziali applicazioni. Ancor più preoccupanti sono le recenti osservazioni che il processo di riprogrammazione stesso possa essere accompagnato (se non addirittura causato) dall'induzione e successiva selezione di mutazioni genetiche associate alla riattivazione dei geni del ciclo cellulare, che potrebbero essere incomplete. Inoltre, le cellule adulte trasformate, sebbene ringiovanite ad uno stadio embrionale, conservano ancora la loro età genomica, con le relative mutazioni. È a causa di queste preoccupazioni che dobbiamo monitorare con attenzione lo stato dell'arte prima di spingere verso la sperimentazione clinica una tecnologia relativamente nuova e non testata.

## ESEMPI DI CELLULE STAMINALI TISSUTALI ADULTE

### **Le cellule staminali epidermiche**

Le cellule staminali epidermiche derivate dalla pelle sono state le prime cellule staminali adulte umane a essere coltivate in condizioni in cui potevano essere mantenute senza perdere il loro potenziale di rigenerazione dei tessuti. La loro coltura risale al 1975, e alla fine degli anni 70 i ricercatori stavano già utilizzando con successo queste cellule staminali per il trattamento di pazienti gravemente ustionati. Oggi, migliaia di vittime di ustioni in tutto il mondo sono state salvate grazie a questa terapia con le cellule staminali. Negli anni 80 i metodi utilizzati per la coltura di cellule staminali epidermiche sono stati adattati allo sviluppo di tecnologie di coltura per cellule staminali pluripotenti, che hanno infine portato allo sviluppo di cellule iPS. Inoltre, questi metodi sono stati modificati per coltivare cellule staminali corneali per il trattamento di pazienti affetti da cecità a causa di infortuni sul lavoro. Proprio negli ultimi due anni è stata pubblicata una relazione su 100 pazienti la cui cecità è stata curata con successo utilizzando una terapia basata sulle cellule staminali della cornea.

### **Le cellule staminali che danno origine al sangue**

Le cellule staminali che danno origine al sangue [HSC, hematopoietic stem cells] sono tra le cellule staminali tissutali più studiate negli adulti. Le HSC di topo sono state isolate per la prima volta nel 1988 e

quelle umane nel 1992. A livello di singola cellula, sono capaci sia di auto-rinnovarsi sia di dare origine a tutte le cellule del sangue. Le cellule staminali ematopoietiche umane, pure e prive di tumori, isolate da pazienti affetti da cancro metastatico, come per esempio il carcinoma mammario al IV stadio, possono essere congelate mentre il paziente riceve dosi sovraletali di chemioterapia di combinazione, nell'intento di uccidere la maggior parte, se non tutte, le cellule tumorali nel corpo. Successivamente i pazienti possono essere trattati con queste HSC prive di cancro, con la conseguente percentuale di sopravvivenza [secondo prove cliniche condotte a Stanford] del 33% a 13-15 anni, mentre i pazienti trattati con il proprio sangue mobilizzato non depurato, con un 40% circa di campioni contaminati da cellule tumorali della mammella, dimostravano una sopravvivenza generale solo del 7%. Questo primo impiego di cellule staminali purificate adulte umane si può ora applicare a un certo numero di tumori.

Il trapianto di tessuti che generano il sangue in ospiti irradiati o sottoposti a chemioterapia porta a reazioni immunitarie potenzialmente letali da parte dei linfociti T del donatore nei confronti di tutti i tessuti dell'ospite, con una risposta di tipo "trapianto contro ospite" [GvH, graft vs host]. Le cellule HSC pure non possono causare GvH e, quando sono trapiantate in ospiti estranei, danno origine, nel ricevente, a cellule del sangue e a linfociti T che tollerano trapianti di tessuti o di organi dal donatore di HSC o dal ceppo dell'ospite, ma non da terze parti estranee; dal momento che le HSC si auto-rinnovano, quest'unico trattamento mantiene la tolleranza per la vita.

Si determina così un altro impiego dei trapianti di HSC puro: la sostituzione a prova di rigetto GvH dei sistemi sanguigni difettosi [ad esempio, SCID (immunodeficienza combinata grave), anemia falciforme, talassemia], e l'induzione di tolleranza al trapianto di altri tessuti, forse perduti. Questo paradigma dimostra che il trapianto di HSC umane per lesioni post chemio-radioterapiche, per induzioni di tolleranza al trapianto, e per la cura delle malattie sanguigne genetiche e acquisite ha applicazioni immediate. Attualmente, i donatori di HSC sono persone. Forse in futuro le linee di cellule staminali pluripotenti [iPS] forniranno HSC di tipo adulto e altre cellule staminali dei tessuti.

### **Le cellule staminali dell'epitelio intestinale**

Le cellule staminali che rinnovano il rivestimento epiteliale dell'intestino ogni cinque giorni sono state scoperte molti decenni fa. Sono state caratterizzate di recente e possono ora essere coltivate in vitro. Le singole cellule epiteliali intestinali sono in grado di produrre in coltura dei

“mini intestini” in cui si possono riconoscere tutti i tipi di cellule differenziate dell’epitelio intestinale (per maggiori informazioni si veda la seconda parte di questo Statement).

### **Le cellule staminali neurali**

Anche se è stato a lungo ritenuto che, dopo la nascita, non vi fosse produzione di neuroni nuovi nel cervello dei mammiferi, gli ultimi decenni hanno visto la scoperta di cellule staminali neurali attive nel cervello. È stato dimostrato che, in alcune aree del cervello dei mammiferi, la neurogenesi adulta è un fatto normale. L’utilizzo di cellule staminali neurali è previsto per il trattamento di alcuni tipi di malattie neurodegenerative.

Le cellule staminali fetali umane del sistema nervoso centrale (CNS), prospetticamente isolate, possono innestarsi nel cervello dei topi immunodeficienti [ID], dove si auto-rinnovano per tutta la vita nella zona subventricolare [SVZ] dei ventricoli laterali e nel giro dentato dell’ippocampo; esse migrano in modo appropriato [prendendo le vie di progenie delle cellule staminali del sistema nervoso centrale dei topi], e danno luogo, in particolare, a oligodendrociti in modo appropriato a seconda del sito.

Queste cellule staminali del sistema nervoso centrale umano possono mielinizzare topi Shiverer ID tramite oligodendrociti derivati da donatori di cellule staminali del sistema nervoso centrale; studi clinici in pazienti affetti dal morbo di Pelizaeus-Merzbacher mostrano una mielinizzazione derivante da trapianti di cellule staminali del sistema nervoso centrale.

Le cellule staminali del sistema nervoso centrale si innestano, migrano, producono e secernono un enzima mancante nei topi ID con il morbo umano di Batten, e questi enzimi bloccano la neurodegenerazione nei topi; i pazienti affetti dal morbo di Batten allo stadio terminale hanno subito trapianti senza conseguenze avverse correlate al trattamento. I topi ID sottoposti a lesione di contusione alla decima vertebra toracica sono paralizzati, ma la paralisi tende a correggersi grazie alle cellule staminali del sistema nervoso centrale umano (hCNS) che producono interneuroni di migrazione e soprattutto oligodendrociti mielinizzanti; l’uccisione di queste cellule neurali umane mature provoca una rapida demielinizzazione e il ritorno della paralisi; tre pazienti con lesioni toraciche del midollo spinale sono ormai a settimane o mesi dal trapianto con questi stessi lotti di cellule staminali del sistema nervoso centrale umano. Pertanto, l’isolamento prospettico di cellule staminali del sistema nervoso centrale umano ha permesso di sperimentare in fase preclinica la loro capacità di trattare malattie in cui le cellule vengono attualmente utilizzate nei pazienti.

### **Usi non appropriati del termine “cellula staminale”**

Diversi studi hanno dimostrato che le HSC danno origine al sangue, e solo al sangue. Ciò è vero anche delle HSC del sangue del cordone ombelicale umano, e anche dal sangue intero del cordone ombelicale, che pertanto non può essere una fonte di cellule staminali pluripotenti. Neanche le cellule stromali mesenchimali, erroneamente chiamate cellule staminali mesenchimali, danno luogo ad alcuna rigenerazione dei tessuti, anche se è stato dimostrato che hanno un'azione anti-infiammatoria molto temporanea nei tessuti in cui entrano. Pertanto, a parte nel primo stadio embrionale, le cellule staminali pluripotenti non esistono nell'organismo. **Neanche le cosiddette cellule staminali [VSEL, Very Small Embryonic-Like (stem cells)] danno origine a sangue o ad altri tessuti quando sono testate in vitro e in vivo – sono principalmente frammenti con <math>2n</math> quantità di DNA, e le piccole cellule possono essere contaminate con autentiche cellule staminali umane grandi CD45+, dalle quali potrebbe dipendere la loro attività ematopoietica.**

**Nel loro insieme, dopo la nascita, non siamo riusciti a trovare, nei topi o nell'uomo, nessuna cellula somatica pluripotente e tutte le cellule staminali sono limitate alla rigenerazione di tipi di cellule del tessuto da cui provengono.**

È sorprendente che, ventiquattro anni dopo il primo isolamento di una cellula staminale tissutale, solo il sangue, il cervello, la pelle, la cornea, il muscolo di topo, l'intestino di topo, e le cellule staminali osteocondrali di topo siano state preparate in forme pure e prospetticamente isolabili. Vi è un bisogno urgente di trovare delle alternative alle cellule staminali di tessuti o organi del topo e dell'uomo per mettere alla prova il loro ruolo nella medicina rigenerativa, a prescindere dal fatto che queste cellule vengano scoperte nei tessuti umani o siano derivate da cellule staminali pluripotenti indotte.

### **L'origine evolutiva delle cellule staminali**

Lo straordinario potere proliferativo delle cellule staminali è illustrato particolarmente bene in determinati organismi. Ad esempio, le piante quali la Azorella negli altipiani delle Ande o le Sequoie nella regione del Pacifico nordoccidentale degli Stati Uniti, crescono e vivono migliaia di anni perché le cellule staminali che possiedono nelle radici apicali e nei meristemi producono continuamente la progenie necessaria alla produzione dei tessuti differenziati che si trovano nell'anatomia dell'organismo.

Gli animali come la Planaria contengono, nel proprio corpo, cellule staminali pluripotenti in grado di rinnovare costantemente le cellule dif-

ferenziate dei loro organi dopo la scomparsa di esse per morte cellulare naturale (apoptosi). Queste cellule staminali sono anche in grado di conferire a questi organismi complessi la capacità di riprodursi in maniera asessuata tramite scissiparità a tempo indeterminato. Le cellule staminali, quindi, hanno un ruolo importante nell'omeostasi cellulare di quasi tutti gli organismi pluricellulari e le molecole associate alla regolazione della divisione cellulare e alla proliferazione sono molecole evolutivamente antiche risalenti alla nascita di piante e metazoi. È interessante notare che molte di queste molecole, attive nelle cellule staminali, sono note per essere associate con il cancro. Tuttavia, dal momento che molte di queste molecole si trovano in organismi unicellulari, è improbabile che si siano evolute per causare il cancro. È probabile invece che si siano evolute per rilevare cambiamenti nell'ambiente permettendo alle cellule di proliferare in risposta al danno e/o all'usura fisiologica.

**Date le molteplici e note funzioni delle cellule staminali, è ovvio che un numero altrettanto vasto di funzioni biologiche sconosciute resti ancora da scoprire. Pertanto, appare opportuno che, se vogliamo davvero capire le cellule staminali e la loro straordinaria biologia embrionale e adulta, ed essere in grado di usarle in medicina, occorre aprire parecchie altre porte alla ricerca scientifica delle nuove cellule iPS, di cui molto resta ancora da capire.**

### **L'unità e la diversità delle cellule staminali, e l'era della medicina rigenerativa**

Il predecessore di questo workshop dell'Accademia si è svolto nel 2003. Da allora una serie di progressi scientifici e finanziamenti hanno accelerato a un ritmo sorprendente quasi tutti gli aspetti della ricerca sulle cellule staminali. Gli scienziati di tutto il mondo si stanno rivolgendo alle varie cellule staminali come bersaglio preferito per capire la scienza basilare delle cellule, la differenziazione e la malattia in una varietà di tessuti e utilizzando una varietà di specie. La traduzione precoce delle terapie con cellule staminali pure è maturata giungendo a progressi molto significativi nel trattamento di alcune malattie, come il carcinoma mammario metastatico. Le cellule staminali del cervello vengono trapiantate sperimentalmente negli animali per scoprire i loro misteri relativi ad auto-rinnovamento, migrazione, differenziazione e funzione, e sono in corso o in programma molti studi clinici che utilizzano cellule staminali cerebrali per malattie altrimenti incurabili. Questi studi sono monitorati in ogni istituto da enti di revisione indipendenti che hanno il potere di guidare, cambiare, e persino fermare gli studi sugli esseri umani. Alcuni studi di tossicità preliminari si stanno muo-



vendo verso studi clinici di fase successiva di cui l'efficacia può essere determinata, il tutto sotto la guida di agenzie nazionali di regolamentazione, come la FDA (Food and Drug Administration) e la EMA (European Medicines Agency). D'altra parte, alcuni sistemi di coltura come la pelle (in condizioni di uso clinico dal 1984) e la cornea (in condizioni di utilizzo clinico dal 1997) sono già ben consolidati.

Nel 2003 l'unico metodo verosimile di creare linee di cellule staminali pluripotenti da individui predesignati, catturando la genetica della loro salute e delle loro malattie in linee cellulari capaci di produrre la maggior parte, se non tutti, i tipi di cellule nel corpo, era tramite lo scomodo processo del trasferimento nucleare di cellule somatiche negli ovociti dalla stessa specie, senza successo né allora né adesso utilizzando cellule umane. La straordinaria scoperta di Yamanaka et al. che i geni pluripotenziali potessero essere trasferiti in quasi tutte le cellule del corpo ordinarie e potessero riprogrammarle, ha aperto il campo della biologia delle cellule staminali pluripotenti indotte [iPS] a tutti i ricercatori qualificati, compresi quelli che non avrebbero accettato di lavorare su tessuti derivati da embrioni o feti. Ciò ha ampliato la ricerca non solo a tutti i ricercatori, ma ha anche permesso di produrre cellule staminali pluripotenti da tutti i tipi di esseri umani, ricchi o poveri, appartenenti a vari gruppi etnici, o anche da persone con inclinazioni genetiche semplici o complesse per la malattia, e anche dalle stesse malattie. In particolare, le iPS non sono ancora prive del rischio di cancro e orientare queste cellule pluripotenti verso uno stato differenziato stabile resta una sfida che gli scienziati di tutto il mondo stanno lavorando attivamente per affrontare.

Il tempismo di questo workshop è stato quindi molto appropriato e ha permesso agli scienziati delle cellule staminali dei più alti livelli e ai ricercatori pionieristici nel campo della ricerca traslazionale e della medicina rigenerativa, e persino ai biologi e medici che studiano le cellule staminali del cancro, di presentare e discutere i loro progressi nel campo. Tuttavia, su questi sforzi aleggia come una nube nera l'emergere fuorviante o errato, o francamente fraudolento, di cosiddette "terapie con cellule staminali". Collettivamente, queste sono commercializzazioni, spesso molto redditizie, che non hanno basi scientifiche che ne garantirebbero il successo e non sono sottoposte a supervisione né da parte dei comitati di revisione indipendenti per garantirne la sicurezza, né delle agenzie di regolamentazione per controllarne e certificarne l'etica, la sicurezza e l'efficacia. Alcune di queste terapie con cellule staminali non usano nemmeno cellule staminali in grado di rigenerare il tessuto, e in alcuni casi quelle che usano non sono neanche cellule. Alcuni

di questi centri hanno cercato e ricevuto il sostegno delle più importanti e influenti istituzioni nella società moderna. Il workshop ha allertato l'Accademia e l'istituzione a cui fa capo, il Vaticano, dell'esistenza di questi elementi pericolosi.

Ciononostante, il quadro complessivo è quello di un campo che, come un treno a velocità supersonica, non solo ha lasciato la stazione ma sta accelerando verso ulteriori progressi nella scienza e nella medicina. Ci auguriamo che le presenti osservazioni stimolino un dibattito utile e illuminato in occasione della riunione autunnale del Consiglio della Pontificia Accademia delle Scienze.

Firmato da: WERNER ARBER, NICOLE LE DOUARIN, ALEJANDRO SÁNCHEZ ALVARADO, HANS CLEVERS, IRVING WEISSMAN, RUDOLF JAENISCH, AUSTIN SMITH, HELEN BLAU, ELAINE FUCHS, ARTURO ÁLVAREZ-BUYLLA, GIULIO COSSU, GRAZIELLA PELLEGRINI, ANGELO VESCOVI, VANIA BROCCOLI, CAMILLO RICORDI, RAFAEL VICUÑA.

Printed by  
The Pontifical Academy of Sciences  
July 2012

