

Μεσεγχυματικά κύτταρα: Ιδιότητες και κλινικές εφαρμογές

Αριστέα Κ. Μπάτσαλη, Ελένη Α. Παπαδάκη, Χαράλαμπος Ποντίκογλου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: Τα μεσεγχυματικά κύτταρα του στρώματος (mesenchymal stromal cells-MSCs) του μυελού των οστών είναι πολυδύναμα προγονικά κύτταρα, που μπορούν να αυτο-ανανεώνονται και να διαφοροποιούνται προς λίπος, οστό και χόνδρο, τους τρεις κύριους, δηλαδή, ιστούς μεσεγχυματικής προέλευσης. Τα MSCs διαθέτουν επίσης ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες και μειωμένη ανοσογονικότητα. Τα χαρακτηριστικά αυτά, σε συνδυασμό με την ευχερή απομόνωση των κυττάρων από τον μυελό των οστών και την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται ταχέως *in vitro*, οδήγησαν σε μια σειρά μελετών, όπου εξετάζεται η δυνατότητα θεραπευτικής χρησιμοποίησης των MSCs σε διάφορες κλινικές εφαρμογές. Η παρούσα ανασκόπηση παρουσιάζει κριτικά τα υπάρχοντα δεδομένα σχετικά με τη βιολογία των MSCs και συνοψίζει τις κλινικές μελέτες αναφορικά με τη χρήση των κυττάρων σε αντιπροσωπευτικές εφαρμογές αναγεννητικής ιατρικής/ιστικής μηχανικής, καθώς και στη μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων.

Haema 2013; 4(3): 283-291 Copyright EAE

Πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών

Ιστορικά, πειστική απόδειξη ότι ο μυελός των οστών περιλαμβάνει εκτός από πολυδύναμα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα και μη αιμοποιητικά τοιαύτα προέκυψε για πρώτη φορά από τις πρωτοποριακές μελέτες των Friedenstein και συν. στα τέλη μέσα της δεκαετία του 1960¹. Χρησιμοποιώντας υγρές μυελικές καλλιέργειες, οι ερευνητές διέκριναν μεμονωμένες αποικίες επιμήκων κυττάρων δίκην ινοβλαστών, οι οποίες όταν μεταμοσχεύονταν υπό την νεφρική κάψα ζώων μπορούσαν να διαφοροποιούνται σε κύτταρα χόνδρου, οστίτη και ινώδη ιστού. Μεταγενέστερες μελέτες στις δεκαετίες του 1980 και 1990 επεξετέιναν τα ως άνω δεδομένα και κατέστησαν σαφές ότι τα κύτταρα που ταυτοποιήθηκαν από τους Friedenstein και συν. ήταν πολυδύναμα και μπορούσαν να δώσουν γένεση σε κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης, όπως οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα²⁻⁴.

Από την αρχική τους περιγραφή και εξής, τα μυελικά μη αιμοποιητικά πολυδύναμα προγονικά κύτταρα έχουν

λάβει, κατά καιρούς, ποικίλες ονομασίες. Το 1991⁵ υιοθετήθηκε για πρώτη φορά ο όρος στελεχειαία μεσεγχυματικά κύτταρα, που ακολούθως βρήκε μεγάλη απήχηση στη βιβλιογραφία. Εντούτοις, η ορθότητα του όρου έχει αμφισβητηθεί από ορισμένους συγγραφείς, οι οποίοι υποστηρίζουν ότι τα μεσεγχυματικά κύτταρα του στρώματος (MSCs) ενδεχομένως να μην πληρούν τα αυστηρά κριτήρια ενός στελεχειαίου κυττάρου. Με βάση την άποψη αυτή η International Society for Cellular Therapy έχει προτείνει το όρο πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα του στρώματος (multipotent mesenchymal stromal cells)⁶.

Αφήνοντας κατά μέρος την ορολογία είναι αξιοσημείωτο ότι εκτός από τον μυελό των οστών, παρόμοια MSCs έχουν απομονωθεί και από ποικίλους άλλους ιστούς, όπως ο λιπώδης ιστός, οι σκελετικοί μύες, το περιόντιο, το περιχόνδριο, ο αρθρικός υμένας, το αμνιακό υγρό και ο πλακούντας, καθώς και το εμβρυϊκό αίμα, το ήπαρ, ο πνεύμονας και ο σπλήνας⁷. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι πληθυσμοί αυτοί των μεσεγχυματικών κυττάρων δεν είναι ισότιμοι ως προς την ικανότητα διαφοροποίησης τους. Το παρόν κείμενο θα εστιαστεί στα μυελικά MSCs, που αποτελούν μέχρι στιγμής και τον καλύτερα χαρακτηρισμένο κυτταρικό πληθυσμό.

Θα πρέπει να τονιστεί, ότι τα περισσότερα δεδομένα αναφορικά με τα βιολογικά χαρακτηριστικά των MSCs του μυελού των οστών προέρχονται από *in vitro* μελέτες, που έχουν γίνει σε καλλιιεργηθέντα κύτταρα. Επί του παρόντος, η απομόνωση και η ταυτοποίηση των μυελικών

Εργαστήριο Μελέτης της Αιμοποίησης και Αιματολογική Κλινική, Τμήμα Ιατρικής Παν/μίου Κρήτης, Ηράκλειο, Κρήτη

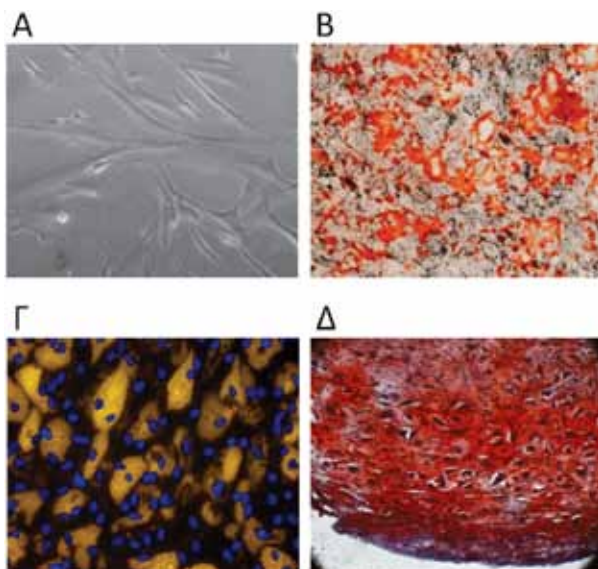
Διεύθυνση αλληλογραφίας: Χαράλαμπος Ποντίκογλου, Λέκτορας Αιματολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης, Αιματολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, Αιματολογική Κλινική ΠαΓΝΗ, Τ.Θ. 1352, Ηράκλειο, Κρήτη, Τηλ.: 2810 392426, Fax: 2810 392426

E-mail: c.pontikoglou@med.uoc.gr, pontikoglou@yahoo.com

MSCs βασίζεται κυρίως στην ικανότητά τους να προσκολλώνται στον πυθμένα της καλλιεργητικής φλάσκας, στον ανοσοφαινότυπο και στη δυνατότητά τους να διαφοροποιούνται, υπό τις κατάλληλες συνθήκες, σε οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα (εικόνα).

Σε ό,τι αφορά στον ανοσοφαινότυπο των MSCs, τα καλλιεργούμενα κύτταρα εκφράζουν μια σειρά μη ειδικών αντιγόνων επιφανείας, όπως CD44 (hyaluronan receptor), CD73 (ecto nucleotidase), CD90 (thy-1), CD105 (transforming growth factor- β receptor III), CD146 (melanoma-cell adhesion molecule, Mel-CAM), ενώ αντίθετα δεν εκφράζουν τους αιμοποιητικούς δείκτες CD45, CD34, CD11b, CD14, CD19^{2,8,9}. Επιπλέον, τα MSCs εκφράζουν χαμηλά επίπεδα αντιγόνων μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης I, ενώ αντιγόνα τάξης II ανιχνεύονται μόνο μετά από βραχεία επώαση με ιντερφερόνη γ .

Σε αντίθεση με τα καλλιεργηθέντα MSCs, σχετικά περιορισμένα δεδομένα υπάρχουν αναφορικά με τα χαρακτηριστικά των πρωτογενών (native) MSCs (nMSCs), τα οποία δίνουν γένεση στα προσκολλώμενα στην καλλιεργητική φλάσκα κύτταρα. Αυτό οφείλεται εν μέρει στην πολύ μικρή συχνότητα των nMSCs στα μυελικά επιχρίσματα, 1-10 ανά 10^5 εμπύρηννα κύτταρα του μυελού^{10,11},



Εικόνα. (Α) Μορφολογία καλλιεργηθέντων μυελικών MSCs. (Β) Χρώση με Alizarin Red για την ανάδειξη της διαφοροποίησης των MSCs προς οστεοβλάστες, μετά από 21 ημέρες καλλιέργειας σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό. (Γ) Χρώση με Oil Red O για την ανάδειξη της διαφοροποίησης των MSCs προς λιποκύτταρα, μετά από 14 ημέρες καλλιέργειας σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό. Οι πυρήνες των κυττάρων βάφτηκαν με DAPI (μπλε). (Δ) Χρώση με Safranin O για την ανάδειξη της διαφοροποίησης των MSCs προς υπερτροφικά χονδροκύτταρα, μετά από 21 ημέρες σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό.

καθώς επίσης και στην έλλειψη ειδικών δεικτών που να επιτρέπουν την απευθείας απομόνωσή τους από το μυελό. Παρ' όλα αυτά, με βάση τον ανοσοφαινότυπο των καλλιεργηθέντων MSCs, διάφορα μεμβρανικά αντιγόνα έχουν μέχρι στιγμής χρησιμοποιηθεί με σκοπό τον εμπλουτισμό σε μυελικά nMSCs. Μεταξύ των δεικτών αυτών περιλαμβάνονται το αντιγόνο Stro-1, το GD2 (ganglioside), το SSEA4 (stage-specific embryonic antigen), το CD49a, το CD146, το CD200 και το CD271 (neural growth factor receptor)^{10,12,13}. Χρησιμοποιώντας τους δείκτες αυτούς διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν δείξει ότι τα MSCs *in vivo* εντοπίζονται περιαγγειακά και πιθανότατα ταυτίζονται με τα περικύτταρα ή προέρχονται από τα τελευταία. Τα περικύτταρα είναι κύτταρα που ευρίσκονται μακριά από τον αυλό του αγγείου, σε στενή επαφή με τα ενδοθηλιακά κύτταρα¹³⁻¹⁹. Αυτή ακριβώς η *in vivo* εντόπιση των MSCs θα μπορούσε να ερμηνεύσει τη δυνατότητα απομόνωσής τους από ποικίλα όργανα και ιστούς, όπως προαναφέρθηκε.

Ειπώθηκε προηγουμένως ότι τα MSCs χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να διαφοροποιούνται προς οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα. Εντούτοις, έχει υποστηριχθεί ότι ο πολυδύναμος χαρακτήρας των MSCs μπορεί ακόμα να περιλαμβάνει και δυνατότητα διαφοροποίησης προς λεία μυϊκά κύτταρα αγγείων, σκελετικά και καρδιακά μυϊκά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, νευρικό ιστό και ηπατοκύτταρα^{10,11}. Ωστόσο, είναι γενικά παραδεκτό, ότι με εξαίρεση τα λεία μυϊκά κύτταρα αγγείων, δεν υπάρχει μέχρι στιγμής κατηγορηματική απόδειξη αναφορικά με τη διαφοροποίηση των MSCs σε ιστούς μη μεσοδερμικής προέλευσης^{10,11}.

Ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες των MSCs

Μια ενδιαφέρουσα και με μεγάλη κλινική σημασία ιδιότητα των MSCs είναι η ικανότητά τους να διαφεύγουν της ανοσολογικής αναγνώρισης και να αναστέλλουν διάφορες λειτουργίες του ανοσολογικού συστήματος^{10,20-24}. Η μικρή/ενδιάμεση έκφραση αντιγόνων MHC τύπου I, η έλλειψη της έκφρασης αντιγόνων MHC τύπου II, καθώς και η απουσία συν-διεγερτικών (co-stimulatory) μορίων, σε συνδυασμό με το ότι τα MSCs δεν προκαλούν αντιδραστικό πολλαπλασιασμό των T λεμφοκυττάρων, συνηγορούν υπέρ του ότι αυτά έχουν ενδογενώς χαμηλή αντιγονικότητα^{10,20-24}. Αναφορικά με την ανοσοκατασταλτική δράση των MSCs, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι αυτή ενδεχομένως προϋποθέτει ενεργοποίηση με προ-φλεγμονώδεις παράγοντες όπως η IFN- γ σε συνδυασμό με τον TNF- α , την IL-1 α ή την IL-1 β ¹¹. Αν και οι ακριβείς μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η ανοσοκαταστολή δεν είναι ξεκάθαροι, εντούτοις φαίνεται ότι αυτή είναι κατ' αρχάς απόρροια της ικανότητας των MSCs να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και των

ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων μετά από διέγερση με αλλοαντιγόνα ή μη ειδικά μιτογόνα *in vitro*^{10,11}. Το γεγονός αυτό έχει συσχετισθεί με αναχαίτιση (arrest) των T λεμφοκυττάρων στη φάση G0-G1 του κυτταρικού κύκλου, μέσω αναστολής της κυκλίνης D2, καθώς με αύξηση του ποσοστού των T ρυθμιστικών κυττάρων και επαγωγή της διαφοροποίησης προς Th2 κύτταρα^{10,11,20-24}. Για τις δράσεις αυτές των MSCs φαίνεται ότι απαιτείται τόσο διακυτταρική επαφή όσο και έκκριση διαλυτών παραγόντων από τα MSCs, όπως ο TGF-β1 (transforming growth factor- β1), ο HGF (hepatocyte growth factor), ηIDO (indoleamine 2,3-dioxygenase), το NO (nitric oxide) και η PGE2 (prostaglandin 2)²⁰⁻²⁴. Εκτός από τα T-λεμφοκύτταρα, τα MSCs μπορούν επίσης να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των B-λεμφοκυττάρων, των NK κυττάρων, καθώς και των δενδριτικών κυττάρων^{10,11}. Έτσι, τα MSCs διαταράσσουν την ωρίμανση των B λεμφοκυττάρων και την παραγωγή αντισωμάτων από αυτά, ελαττώνουν την παραγωγή κυτταροκινών από τα NK κύτταρα και τέλος αναστέλλουν τη διαφοροποίηση, την ωρίμανση και ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων²⁰⁻²⁴. Θα πρέπει πάντως να τονιστεί ότι η ανοσοκατασταλτική/ανοσορρυθμιστική δράση των MSCs εξαρτάται/ευοδώνεται από φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως η IFNγ, οTNF-α και οι συνδέτες των toll-like υποδοχέων. Έχει επίσης προταθεί ότι τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των MSCs τροποποιούνται ανάλογα με τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα: για παράδειγμα ανάλογα με τη συγκέντρωση της IFNγ στο περιβάλλον, τα MSCs μπορούν να δράσουν είτε ως αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα είτε ως ανοσοκατασταλτικά τοιαύτα^{11,22}.

Κλινικές εφαρμογές των MSCs

Όταν τα MSCs προστεθούν στην καλλιεργητική φλάσκα, εισέρχονται καταρχάς σε μία φάση προσαρμογής (lag phase) και ακολούθως αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται γρήγορα, με χρόνο διπλασιασμού του πληθυσμού (population doubling time) που ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία του δότη και την αρχική πυκνότητα των κυττάρων. Εν συνεχεία, όταν ο πυθμένας της φλάσκας καταστεί συρρέων (confluent) τα κύτταρα αποκολλώνται ενζυματικά και καλλιεργούνται εκ νέου και αυτή η διαδικασία -γνωστή ως passage- μπορεί να επαναλαμβάνεται διαδοχικά για 20-50 διπλασιασμούς του πληθυσμού². Ακριβώς λόγω αυτής της δυνατότητας εκτενούς *in vitro* πολλαπλασιασμού, καθώς επίσης και της ικανότητάς τους για διαφοροποίηση προς διάφορους τύπους κυττάρων, σε συνδυασμό και με τις ανοσορρυθμιστικές τους ιδιότητες, τα MSCs καθίστανται πολύτιμο εργαλείο για ιστική επιδιόρθωση. Η άποψη αυτή ενισχύεται από μια σειρά μελετών, στις οποίες έχει περιγραφεί επιτυχής ενσωμάτωση (engraftment) των MSCs σε διάφορους ιστούς μετά από

τοπική έγχυση των κυττάρων, ιδιαίτερα δε επί εδάφους ιστικής βλάβης^{18,25}. Ωστόσο, η μετανάστευση (homing), η ενσωμάτωση -είτε πρόκειται για πραγματική τοιαύτη είτε για σύντηξη με τα κύτταρα του ιστού- αλλά και η διαφοροποίηση των MSCs εντός του νοσούντος ιστού είναι ως επί το πλείστον πολύ περιορισμένες, για να θεωρηθεί ότι ευθύνονται σε σημαντικό βαθμό για την παρατηρούμενη ιστική αναγέννηση^{7,16,18,25,26}. Έτσι, πολλές ερευνητικές ομάδες υποστηρίζουν ότι τα ευεργετικά θεραπευτικά αποτελέσματα των MSCs θα πρέπει να αποδίδονται, κατά κύριο λόγο, σε παρακρινείς δράσεις των κυττάρων, μέσω έκκρισης βιοδραστικών παραγόντων με αυξητικές, αντιφλεγμονώδεις ή/και ανοσοκατασταλτικές, αγγειογενετικές και αντι-αποπτωτικές ιδιότητες^{7,16,18,25,26}.

Είναι γενικά παραδεκτό ότι το πρωτόκολλο απομόνωσης MSCs από τον μυελό των οστών, ο τύπος του θρεπτικού υλικού που χρησιμοποιείται κατά την *ex vivo* καλλιέργεια, καθώς και η διάρκεια της καλλιέργειας επηρεάζουν την ικανότητα των κυττάρων να εκκρίνουν βιοδραστικούς παράγοντες. Ως εκ τούτου, σε μια προσπάθεια να υιοθετηθούν κοινά πρωτόκολλα απομόνωσης και συνθηκών καλλιέργειας MSCs, το European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) συνιστά η καλλιέργεια μυελικών μονοπύρηνων κυττάρων να γίνεται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει 10% ορό εμβρύου βοός^{29,30}. Τα κύτταρα θα πρέπει να ανακαλλιεργούνται όταν οι καλλιέργειες γίνουν confluent σε ποσοστό περίπου 90%, και να συλλέγονται στο 1^ο-4^ο passage. Πριν χορηγηθεί στον ασθενή, το κυτταρικό παρασκεύασμα θα πρέπει να μην περιέχει συσσωματώματα και να μην έχει ενδείξεις μόλυνσης από κάποιο παθογόνο. Επιπλέον, τα κύτταρα θα πρέπει να έχουν ατρακτοειδές σχήμα, να εκφράζουν σε ποσοστό 90% του δείκτες επιφανείας CD73, CD90 και CD105, αλλά όχι τους δείκτες CD34, CD45, CD14 και CD3. Τέλος το κύτταρα θα πρέπει να χορηγούνται είτε “φρέσκα” (χωρίς, δηλαδή, προηγουμένως να έχουν καταψυχθεί) είτε αφού έχει προηγηθεί κρυοσυντήρηση σε 10% dimethylsulfoxide^{29,30}.

A. MSCs για τη θεραπεία της νόσου μοσχεύματος κατά του ξενιστή

Η νόσος μοσχεύματος κατά ξενιστή (graft versus host disease, GVHD) αποτελεί τη σοβαρότερη επιπλοκή της αλλογενούς μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Πρόκειται για μείζονα φλεγμονώδη κατάσταση, απόρροια της ανοσολογικά διαμεσολαβούμενης “επίθεσης” T λεμφοκυττάρων του δότη, που υπάρχουν στο μόσχευμα, σε ιστούς του δέκτη²⁷. Ως θεραπεία πρώτης γραμμής προκρίνονται τα στεροειδή. Επί αποτυχίας, ωστόσο, αυτών, οι διαθέσιμες εναλλακτικές θεραπευτικές επιλογές είναι γενικά μη αποτελεσματικές, με συνέπεια, η πρόγνωση της ανθεκτικής στα στεροειδή GVHD

να είναι ιδιαίτερα δυσμενής²⁷. Ως εκ τούτου η ανάγκη εξεύρεσης καινούργιων θεραπειών κρίνεται επιτακτική. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τις *in vivo* και *in vitro* τεκμηριωμένες ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες των MSCs, έθεσαν τις βάσεις για τη διερεύνηση του ρόλου των τελευταίων στη θεραπεία ή/και πρόληψη της GVHD.

Η αποτελεσματικότητα των MSCs στην αντιμετώπιση της ανθεκτικής στην ανοσοκατασταλτική αγωγή οξείας GVHD (της εμφανιζόμενης, δηλαδή, στις πρώτες 100 ημέρες από την αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων διαπιστώθηκε για πρώτη φορά σε ένα παιδί 9 ετών²⁸. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε και σε άλλες μικρές σειρές ασθενών (ιδέ ανασκοπήσεις^{10,27,29}) καθώς και σε μία πολυκεντρική μελέτη φάσης II, τη μεγαλύτερη μελέτη μέχρι σήμερα³⁰. Στην εργασία αυτή συμμετείχαν 55 ασθενείς, ενήλικες και παιδιά, οι οποίοι έλαβαν 1-5 εγχύσεις MSCs, από HLA-ταυτόσημους συγγενείς δότες, απλοταυτόσημους δότες ή μη συμβατούς μη συγγενείς δότες. Η θεραπεία δεν παρουσίασε καμία μείζονα επιπλοκή και οδήγησε σε πλήρη ανταπόκριση 30/55 ασθενείς και σε μερική ανταπόκριση 9/55 πάσχοντες. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι ασθενείς με πλήρη ανταπόκριση είχαν σημαντικά μεγαλύτερη επιβίωση στα 2 χρόνια, σε σχέση με εκείνους που ανταποκρίθηκαν μερικώς ή καθόλου.

Το κλινικό όφελος από τη χορήγηση μυελικών MSCs σε ασθενείς με οξεία GVHD έχει επιβεβαιωθεί και σε άλλες μικρότερες μελέτες. Ωστόσο μεταξύ των διαφόρων εργασιών παρουσιάζεται σημαντική διακύμανση (16%-77%) στα ποσοστά ανταπόκρισης, (ιδέ ανασκοπήσεις^{10,27}), γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί στην ετερογένεια των ασθενών ως προς τα χαρακτηριστικά της GVHD, καθώς και στην ποικιλία των πρωτοκόλλων χορήγησης MSCs.

Δεδομένου ότι η ασυμβατότητα HLA μεταξύ του δότη και του δέκτη MSCs δεν εγκυμονεί κινδύνους ούτε επηρεάζει την αποτελεσματικότητα των κυττάρων, τα τελευταία χρόνια διεξάγονται ποικίλες κλινικές μελέτες στηριζόμενες στο Prochymal®, ένα εμπορικά διαθέσιμο σκεύασμα MSCs. Έτσι, Prochymal® έχει χορηγηθεί σε 12 παιδιατρικούς ασθενείς, για την αντιμετώπιση ανθεκτικής στη θεραπεία οξείας GVHD³¹. Επτά στα 12 παιδιά είχαν πλήρη και 2/12 μερική ανταπόκριση στη θεραπεία, ενώ 9/12 παιδιά παρουσίασαν πλήρη ύφεση της GVHD στο γαστρεντερικό. Το 2010 ανακοινώθηκαν προκαταρκτικά αποτελέσματα από μια διπλή, τυφλή τυχαιοποιημένη placebo-ελεγχόμενη μελέτη έγχυσης Prochymal σε 192 ασθενείς με σοβαρή ανθεκτική οξεία GVHD³². Η επιβίωση στις 100 ημέρες δε διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων της μελέτης, εντούτοις η έγχυση των MSCs οδήγησε σε σημαντικά μεγαλύτερη πλήρη ανταπόκριση στην GVHD του ήπατος ή του γαστρεντερικού συστήματος, σε σχέση με την ομάδα placebo.

Εκτός από τη θεραπεία της οξείας GVHD, υπό διερεύνηση βρίσκεται επίσης ο ρόλος των μυελικών MSCs

στην αντιμετώπιση της χρόνιας GVHD. Πιο συγκεκριμένα, σε μια μελέτη 19 ασθενών με ανθεκτική χρόνια GVHD³³, η χορήγηση μυελικών MSCs οδήγησε σε πλήρη ανταπόκριση σε 14/19 ασθενείς, ενώ σε 5 εξ' αυτών η ανοσοκατασταλτική θεραπεία διεκόπη μετά από διάμεση περίοδο 384 ημερών από την έγχυση των κυττάρων. Σε μια πιο πρόσφατη εργασία³⁴ συμπεριελήφθησαν 8 ενήλικες ασθενείς με χρόνια GVHD που έλαβαν διάφορες δόσεις MSCs. Εξ' αυτών, ένας ασθενής πέτυχε πλήρη ύφεση της GVHD, 3 μερική ύφεση ενώ 3 ασθενείς δεν είχαν καμία ανταπόκριση στη χορήγηση των κυττάρων. Αν και τα υπάρχοντα δεδομένα είναι περιορισμένα, η έγχυση MSCs θεωρείται ότι επιτυγχάνει μικρότερα ποσοστά πλήρους ύφεσης στην οξεία GVHD, σε σχέση με την χρόνια τοιαύτη²⁹.

Συμπερασματικά, η έγχυση MSCs φαίνεται ότι αποτελεί ελπιδοφόρα προσέγγιση στη αντιμετώπιση της GVHD, ιδίως δε σε παιδιατρικούς ασθενείς. Ωστόσο με δεδομένο ότι στις παραπάνω μελέτες τα MSCs συγχωρηγούνται με ανοσοκατασταλτική αγωγή, δεν μπορεί, μέχρι στιγμής, να εκτιμηθεί επακριβώς το πραγματικό όφελος από αυτή καθαυτή την κυτταρική θεραπεία.

B. MSCs για την ενίσχυση της ενσωμάτωσης (engraftment) και την πρόληψη της GVHD

Σύμφωνα με *in vitro* πειράματα και μελέτες σε ζώα τα μυελικά MSCs μπορούν να προάγουν την *ex-vivo* παραγωγή (expansion) και διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs), να ευοδώσουν την ενσωμάτωση (engraftment) των HSCs σε NOD-SCID ποντίκια και σε έμβρυα προβάτων³⁵⁻³⁷ και να υποστηρίζουν την ανασύσταση (reconstitution) της μυελικής και λεμφικής σειράς^{36,38}. Τα παραπάνω προκλινικά δεδομένα, συνδυαζόμενα με το γεγονός ότι η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία έχουν τοξική δράση στο μυελικό στρώμα έθεσαν το θεωρητικό υπόβαθρο για διενέργεια δοκιμών στον άνθρωπο, προκειμένου να διερευνηθεί κατά πόσο η συγχωρήγηση μυελικών MSCs και HSCs μπορεί πραγματικά να ενισχύσει την ενσωμάτωση των τελευταίων. Στην πρώτη τέτοια μελέτη φάσης I/II³⁹, η συγχωρήγηση HSCs και αυτόλογων μυελικών MSCs, οδήγησε σε επιτάχυνση της αιματολογικής ανάκαμψης, σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού που υποβλήθηκαν σε μεγαθεραπεία και αυτόλογη μεταμόσχευση HSCs περιφερικού αίματος. Ωστόσο λόγω του μη τυχαιοποιημένου χαρακτήρα της μελέτης, δεν διευκρινίστηκε επακριβώς ο υποστηρικτικός ρόλος των MSCs. Σε μια μεταγενέστερη μελέτη σε παιδιά⁴⁰, συγχωρήγηση MSCs και HSCs⁴⁰ από απλοταυτόσημους δότες είχε ως αποτέλεσμα ταχύτερη ανάκαμψη των λευκών αιμοσφαιρίων. Ωστόσο τα ποσοστά της χρόνιας και οξείας GVHD ήταν συγκρίσιμα με εκείνα της ομάδας των μαρτύρων (historic controls).

Ο ρόλος των μυελικών MSCs έχει επίσης διερευνηθεί και στο πλαίσιο της μεταμόσχευσης ομφαλικού αίματος. Όπως έδειξαν δύο πρόσφατες μελέτες σε παιδιατρικούς ασθενείς^{41,42}, η συγχρήγηση ομφαλικών HSCs και μυελικών MSCs από συγγενείς ή μη συγγενείς δότες δεν φάνηκε να επιταχύνει την αιματολογική ανάκαμψη ή να μειώνει τα ποσοστά της απόρριψης του μοσχεύματος. Σε ότι αφορά στην πρόληψη της οξείας GVHD, η μία εργασία⁴¹ έδειξε ότι τα ποσοστά αυτής δεν διέφεραν από την ομάδα των μαρτύρων, ενώ σύμφωνα με τη δεύτερη εργασία στους ασθενείς που έλαβαν MSCs δεν παρατηρήθηκαν περιπτώσεις σοβαρής GVHD (grade III/IV)⁴². Σε μια άλλη μελέτη φάσης I/II⁴³, ενήλικες ασθενείς έλαβαν αλλογενή MSCs, μετά από συγχρήγηση αλλογενούς ομφαλικού αίματος και αλλογενών αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων. Ωστόσο η έγχυση MSCs δεν επηρέασε ούτε την κινητική της ενσωμάτωσης ούτε τη συχνότητα της οξείας GVHD.

Η πρωτοπαθής απόρριψη μοσχεύματος (graft failure) αποτελεί μία σπάνια, σοβαρή και ενδεχομένως απειλητική για τη ζωή του δέκτη επιπλοκή της μεταμόσχευσης, για την οποία δεν υπάρχει μέχρι στιγμής αποτελεσματική θεραπεία. Η θέση των MSCs στην αντιμετώπιση της επιπλοκής αυτής διερευνήθηκε σε 6 ασθενείς που μετά από αλλογενή μεταμόσχευση HSCs παρουσίασαν παρατεταμένη υποπλασία στον μυελό των οστών και άλλοτε άλλου βαθμού παγκυτταροπενία, παρά το ότι είχαν 100% χιμαιρισμό δότη. Στην προκειμένη περίπτωση, η έγχυση MSCs 50-286 ημέρες μετά τη μεταμόσχευση των αιμοποιητικών κυττάρων είχε ως αποτέλεσμα την ταχεία αιματολογική ανάκαμψη σε 2/6 ασθενείς⁴⁴.

Ανακεφαλαιώνοντας, οι προαναφερθείσες μικρές και ενίοτε αντικρουόμενες μελέτες δεν επιτρέπουν την αποκρυσταλλωμένη άποψη για το ενδεχόμενο όφελος από την έγχυση MSCs στην ενίσχυση της ενσωμάτωσης των HSCs και στην πρόληψη του GVHD ή στην αντιμετώπιση της πρωτοπαθούς απόρριψης του μοσχεύματος. Για να ξεκαθαρισθεί αν οι προσδοκίες από τις εν λόγω κλινικές εφαρμογές των MSCs είναι δικαιολογημένες ή μη, απαιτούνται μεγάλες πολυκεντρικές μελέτες, αφού προηγουμένως οι διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν καταλήξει ομόφωνα σε ζητήματα που σχετίζονται με το πρωτόκολλο, τη διάρκεια καλλιέργειας των κυττάρων, την προέλευσή τους (άλλογενή ή αυτόλογα), τη χορηγούμενη δόση και τη χρονική στιγμή της χορήγησης αυτών.

G. Ο ρόλος των MSCs στην επιδιόρθωση του οστού και του χόνδρου

Η ικανότητα των MSCs να διαφοροποιούνται σε χονδροκύτταρα και οστεοκύτταρα τα καθιστά ελκυστικούς υποψήφιους για ιστική μηχανική (tissue engineering)⁴⁵⁻⁴⁸. Έτσι μυελικά MSCs, τα οποία προηγουμένως έχουν καλ-

λιεργηθεί σε τρισδιάστατα ικρίωματα (scaffolds), φαίνεται να προάγουν αποτελεσματικά τον σχηματισμό και/ή την επιδιόρθωση οστού, κατά την *in vivo* εμφύτευσή τους σε διάφορα ζωικά μοντέλα⁴⁷⁻⁵⁰. Μεταγενέστερες κλινικές μελέτες και αναφορές μεμονωμένων περιστατικών ασθενών συνηγορούν στο ότι ανάλογη προσέγγιση στον άνθρωπο είναι εφικτή και ωφέλιμη, τουλάχιστον σε περιπτώσεις συγγενών και επίκτητων οστικών ελλειμμάτων, ψευδάρθρωσης, άσηπτης νέκρωσης μηριαίου και διατακτικής οστεογένεσης^{45,47-50}. Ωστόσο, ο αριθμός των ασθενών που έχει μέχρι στιγμής υποβληθεί σε τέτοιου είδους κυτταρική θεραπεία είναι περιορισμένος και ως εκ τούτου με ενδιαφέρον αναμένονται τα αποτελέσματα μεγαλύτερων κλινικών μελετών με μακρά διάρκεια παρακολούθησης των ασθενών, ώστε να εκτιμηθεί μακροπρόθεσμα η ασφάλεια αλλά και το ευεργετικό αποτέλεσμα της εν λόγω προσέγγισης.

Εκτός από την τοπική - στο σημείο της οστικής βλάβης- χορήγηση MSCs, συστηματική έγχυση αυτών έχει εφαρμοστεί και στην ατελή οστεογένεση (Osteogenesis Imperfecta, OI), με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Πρόκειται για μία γενετική οστική διαταραχή, που χαρακτηρίζεται από ελαττωματική παραγωγή κολλαγόνου τύπου I, με αποτέλεσμα τα οστά να καθίστανται εύθραυστα, γεγονός που οδηγεί σε συχνά κατάγματα, σοβαρές οστικές παραμορφώσεις και ιδιαίτερα χαμηλό ανάστημα. Βασιζόμενοι σε προκλινικά δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία η αλλογενής ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση μυελικών MSCs σε ένα μοντέλο OI ποντικού είχε ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των χορηγηθέντων κυττάρων σε λειτουργικούς οστεοβλάστες⁵¹, οι Horwitz και συν.⁴⁹ προχώρησαν σε αλλογενή μεταμόσχευση MSCs σε 6 παιδιά με σοβαρή OI. Μετά από 6 μήνες σε 5 παιδιά παρατηρήθηκε βελτίωση του ρυθμού οστικής αύξησης καθώς και κάποιου βαθμού οστική ενσωμάτωση των MSCs.

Ένα άλλο πεδίο στο οποίο τα MSCs ενδέχεται να διαδραματίσουν κάποιο ρόλο είναι αυτό της επιδιόρθωσης του χόνδρου. Στηριζόμενοι στο ότι η τοπική έγχυση αυτόλογων καλλιεργηθέντων χονδροκύτταρων, για την αντιμετώπιση ανωμαλιών του αρθρικού χόνδρου, είχε σημαντικό κλινικό όφελος για τους ασθενείς, οι ερευνητές ανέπτυξαν ακολούθως μοντέλα ζώων, όπου MSCs μαζί με διάφορες μήτρες (matrices) εμφυτεύονταν τοπικά για την αποκατάσταση χόνδρινων βλαβών^{45,48,52,53}. Εναλλακτικά, τα MSCs χορηγούνταν αφού πρώτα είχαν καλλιεργηθεί και διαφοροποιηθεί προς χονδροκύτταρα σε κατάλληλο τρισδιάστατο ικρίωμα. Τα θετικά αποτελέσματα από αυτές τις μελέτες^{45,52,53}, έθεσαν τις βάσεις για παρόμοια προσέγγιση στην αντιμετώπιση χόνδρινων ελλειμμάτων και στον άνθρωπο^{47,48}. Τα υπάρχοντα αποτελέσματα αν και είναι ελπιδοφόρα, θεωρούνται, πολύ πρώιμα για να απαντήσουν κατά πόσο η χορήγηση MSCs υπερτερεί, εν προκειμένω, των άλλων θεραπευτικών προσεγγίσεων^{47,48}.

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει, επίσης, απόπειρες για τη θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας (Osteoarthritis - OA) με MSCs. Έτσι, το 2002, αυτόλογα μυελικά MSCs μαζί με κατάλληλη γέλη κολλαγόνου I εμφυτεύθηκαν χειρουργικά σε 12 ασθενείς με OA γόνατος⁵⁴. Παρά το ότι δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την κλινική βελτίωση, σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων στην οποία εμφυτεύθηκε μόνο γέλη χωρίς MSCs, εντούτοις οι ασθενείς που έλαβαν τα κύτταρα παρουσίασαν σαφώς καλύτερη αρθροσκοπική και ιστολογική εικόνα. Έχει επίσης δοκιμαστεί και η ενδοαρθρική έγχυση MSCs (χωρίς δηλαδή ν' απαιτηθεί χειρουργική παρέμβαση) σε πάσχοντες με OA, μετά από καλλιέργεια των κυττάρων και *ex vivo* διαφοροποίηση προς χονδροκύτταρα⁴⁸. Η μέθοδος είναι ασφαλής και έχει επιδείξει κλινικό όφελος σε έναν ασθενή. Εντούτοις η αποτελεσματικότητά της θα πρέπει προφανώς να εκτιμηθεί μακροχρόνια σε τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες κλινικές μελέτες.

Δ. Ο ρόλος των MSCs σε βλάβες του ΚΝΣ

Το ενδεχόμενο τα MSCs να διαφοροποιούνται προς κύτταρα νευρικού ιστού, δηλαδή κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης να δίνουν γένεση σε κύτταρα του εξωδέρματος, φαινόμενο γνωστό ως δια-διαφοροποίηση (transdifferentiation) προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Koren και συν.⁵⁵. Αυτοί διαπίστωσαν ότι MSCs, μετά τη μεταμόσχευση τους στον εγκέφαλο αρουραίων, μετανάστευαν και εξέφραζαν δείκτες νευρικών κυττάρων. Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό και με τα δεδομένα άλλων μελετών, σύμφωνα με τα οποία μυελικά MSCs -παρουσία κατάλληλων αυξητικών παραγόντων ή ειδικών χημικών ουσιών- μπορούν να διαφοροποιούνται *in vitro* σε κύτταρα που μοιάζουν με νευρικά, κέντρισαν το ενδιαφέρον των επιστημόνων αναφορικά με την ενδεχόμενη χρήση τους σε βλάβες του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ)⁵⁶⁻⁵⁸. Πάντως, θα πρέπει να τονιστεί ότι σε καμία από αυτές τις εργασίες δεν αποδείχθηκε πειστικά ότι τα MSCs μπορούν να αποκτούν το φαινότυπο ενός ώριμου και λειτουργικού νευρικού κυττάρου. Από την άλλη μεριά, έχει δείχθει ότι τα μυελικά MSCs εκφράζουν, πριν από οποιαδήποτε διαφοροποίηση, νευρο-επιθηλιακούς δείκτες, όπως η nestin και η β-tubulin III, γεγονός που έχει ερμηνευθεί από ορισμένους ως απόδειξη νευρικής δια-διαφοροποίησης. Πρόσφατα, ωστόσο, έχει προταθεί ότι η έκφραση τέτοιων ειδικών πρωτεϊνών του νευρικού ιστού, καθώς και η ικανότητα των MSCs να διαφοροποιούνται προς κύτταρα που μοιάζουν με νευρικά, θα μπορούσε εναλλακτικά να αποδοθεί στην ύπαρξη εντός του στρώματος και κυττάρων μη μεσοδερμικής προέλευσης. Προς την κατεύθυνση αυτή συνηγορεί πράγματι η μελέτη των Morikawa και συν.⁵⁹, όπου ταυτοποιήθηκε ένας υπο-πληθυσμός των μυελικών MSCs προερχόμενος από τη νευρική ακρολοφία.

Παρολαυτά, τα ευεργετικά αποτελέσματα της χορήγησης MSCs, ως κυτταρικής θεραπείας στο ΚΝΣ, έχουν τεκμηριωθεί επανειλημμένως σε διάφορα μοντέλα ζώων και οι σχετικές μελέτες έχουν δείξει θεραπευτικό όφελος τόσο από την τοπική χορήγηση, όσο και την συστηματική έγχυση MSCs σε αγγειακά εγκεφαλικά, σε τραυματικές βλάβες του εγκεφάλου και του ωτιαίου μυελού, σε νόσο του Parkinson και νόσο του Huntington, καθώς και στην αυτάνοση εγκεφαλιτιδα (το ζωϊκό μοντέλο πολλαπλής σκλήρυνσης)⁵⁶⁻⁵⁸. Είναι αξιοσημείωτο ότι σε ελάχιστες μόνο περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί ικανή αφομοίωση των χορηγούμενων MSCs στον εγκέφαλο των ζώων. Εν προκειμένω ο ευοδωτικός ρόλος των MSCs έχει αποδοθεί στην έκκριση νευρο-τροφικών παραγόντων και νευρο-προστατευτικών κυτταροκινών, στην προαγωγή της αγγειογένεσης, στη δημιουργία ευνοϊκού περιβάλλοντος για ιστική αναγέννηση, στην προστασία από την απόπτωση και τέλος στον περιορισμό της ανοσολογικής και φλεγμονώδους απάντησης⁵⁶⁻⁵⁸.

Βασιζόμενοι στα ενθαρρυντικά προκλινικά δεδομένα, τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί έντονη κινητικότητα αναφορικά με τη χορήγηση MSCs για την αντιμετώπιση ποικίλων νευρολογικών νοσημάτων⁵⁶⁻⁵⁸. Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις η χορήγηση των MSCs φαίνεται ότι έχει γίνει κατά τρόπο μη ελεγχόμενο, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατό να εκτιμηθεί το κατά πόσο το θεραπευτικό πρωτόκολλο είναι εφικτό και αποτελεσματικό. Από τις λίγες δημοσιευμένες μελέτες που παρέχουν έστω και προκαταρκτικά δεδομένα ασφάλειας και αποτελεσματικότητας φαίνεται πάντως ότι η ενδοφλέβια έγχυση αυτόλογων MSCs είναι καλά ανεκτή και ωφελεί τους ασθενείς με ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο⁵⁶⁻⁵⁸. Ακόμα, οι υπάρχουσες μελέτες φάσης I/II συνηγορούν στο ότι η ενδοραχιαία ή η ενδοφλέβια χορήγηση αυτόλογων μυελικών MSCs σε πάσχοντες από πολλαπλή σκλήρυνση είναι ασφαλής και φαίνεται να παρέχει νευροπροστασία^{56-58,60}. Η ακριβής θέση των MSCs στην αντιμετώπιση των διάφορων νευρολογικών διαταραχών, σε σχέση βέβαια και με τις άλλες βιολογικές θεραπείες αναμένεται να ξεκαθαρίσει με μεγάλες τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες, πολλές από τις οποίες είναι υπό εξέλιξη.

Συμπεράσματα

Σαράντα πέντε χρόνια μετά την πρώτη περιγραφή των μυελικών MSCs, τα κύτταρα αυτά μοιάζουν περισσότερο ελκυστικά από ποτέ. Αυτό είναι αποτέλεσμα των συναρπαστικών βιολογικών ιδιοτήτων τους, καθώς και του θεραπευτικού οφέλους από την τοπική και συστηματική χορήγησή τους, όπως προκύπτει από προκλινικές και κλινικές μελέτες. Ωστόσο, πολλά σημεία παραμένουν σκοτεινά αναφορικά με τους μηχανισμούς μέσω των οποίων τα MSCs ασκούν την ευεργετική τους δράση. Επιπλέον,

απαιτούνται περισσότερα δεδομένα σχετικά με την μακροχρόνια ασφάλεια της εν λόγω κυτταρικής θεραπείας. Ακόμα η λεπτομερής μελέτη των MSCs είναι απολύτως αναγκαία, δεδομένου ότι η κατανόηση των ιδιαίτερων χα-

ρακτηριστικών του συγκεκριμένου πληθυσμού αναμένεται να ρίξει φως σε θεμελιώδεις βιολογικές διαδικασίες όπως είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η αυτό-ανανέωση και η διαφοροποίηση.

Mesenchymal cells: Biological Properties and clinical applications

by Aristeia K. Batsali, Helen A. Papadaki, Charalampos Pontikoglou

Department of Haematology & Haematopoiesis Research Lab, University of Crete School of Medicine
Heraklion, Crete, Greece

ABSTRACT: Bone-marrow mesenchymal stromal cells (MSCs) are multipotent, self-renewing precursor cells that can differentiate into bone, fat, cartilage. The ease by which MSCs can be isolated from the bone marrow and expanded *in vitro* as well as their multipotency and their immunomodulatory properties have led to the rapid development of clinical investigations exploring their therapeutic potential. We critically review herein the *in vitro* features of bone marrow-derived MSCs and we discuss their potential therapeutic applications in representative clinical settings and in the context of hematopoietic stem cell transplantation.

Βιβλιογραφία

- Friedenstein AJ. Osteogenic stem cells in Bone Marrow. In: Heersche JNM, Kanis JA, eds. Bone and Mineral Research. Amsterdam: Elsevier; 1990; p. 243-272.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284:143-147.
- Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008; 2:313-319.
- Bianco P, Robey PG, Saggio I, Riminucci M. "Mesenchymal" stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): a critical discussion of their nature, identity, and significance in incurable skeletal disease. *Hum Gene Ther*. 2010; 21:1057-1066.
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991; 9:641-650.
- Dominici M, Le BK, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8:315-317.
- Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*. 2007; 25:2896-2902.
- Delorme B, Charbord P. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. In: Hause H, Fussenegger M, eds. *Methods in Molecular Medicine*, 2nd Edition: Tissue engineering. Humana Press Inc., Totowa NJ, 2007; p. 67-82.
- Deschaseaux F, Pontikoglou C, Sensebe L. Bone regeneration: the stem/progenitor cells point of view. *J Cell Mol Med*. 2010; 14:103-115.
- Pontikoglou C, Deschaseaux F, Sensebe L, Papadaki HA. Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cell Rev*. 2011; 7:569-589.
- Frenette PS, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol*. 2013; 31:285-316.
- Delorme B, Ringe J, Gallay N, et al. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood*. 2008; 111:2631-2635.
- Pontikoglou C, Delorme B, Charbord P. Human bone marrow native mesenchymal stem cells. *Regen Med*. 2008; 3:731-741.
- Deschaseaux F, Charbord P. Human marrow stromal precursors are alpha 1 integrin subunit-positive. *J Cell Physiol*. 2000; 184:319-325.
- Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008; 3:301-313.
- da Silva ML, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009; 20:419-427.
- Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007; 131:324-236.
- da Silva ML, Caplan AI, Nardi NB. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008; 26:2287-2299.

19. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* 2003; 18:696-704.
20. Le BK, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med.* 2007; 262:509-525.
21. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 2007; 110:3499-506.
22. Siegel G, Schafer R, Dazzi F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation.* 2009; 87(Suppl 9):S45-S49.
23. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.* 2006; 36:2566-2573.
24. Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol.* 2007; 28:219-226.
25. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007; 25:2739-2749.
26. Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell.* 2009; 4:206-216.
27. Baron F, Storb R. Mesenchymal stromal cells: a new tool against graft-versus-host disease? *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012; 18:822-840.
28. Le BK, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004; 363:1439-1441.
29. Kim EJ, Kim N, Cho SG. The potential use of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Mol Med.* 2013; 45:e2.
30. Le BK, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008; 371:1579-1586.
31. Prasad VK, Lucas KG, Kleiner GI, et al. Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011; 17:534-541.
32. Martin PJ, Uberti JP, Soiffer RJ, et al. Prochymal improves response rates in patients with steroid-refractory acute graft versus host disease (SR-GVHD) involving the liver and gut: results of a randomized placebo-controlled, multicenter phase III trial in GVHD. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2010; 16:169-170.
33. Weng JY, Du X, Geng SX, et al. Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2010; 45:1732-1740.
34. Perez-Simon JA, Lopez-Villar O, Andreu EJ, et al. Mesenchymal stem cells expanded in vitro with human serum for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease: results of a phase I/II clinical trial. *Haematologica.* 2011; 96:1072-1076.
35. Almeida-Porada G, Porada CD, Tran N, Zanjani ED. Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood.* 2000; 95:3620-3627.
36. in 't Anker PS, Noort WA, Kruisselbrink AB, et al. Nonexpanded primary lung and bone marrow-derived mesenchymal cells promote the engraftment of umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol.* 2003; 31:881-889.
37. Maitra B, Szekely E, Gjini K, et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant.* 2004; 33:597-604.
38. Angelopoulou M, Novelli E, Grove JE, et al. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. *Exp Hematol.* 2003; 31:413-420.
39. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2000; 18:307-316.
40. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood.* 2007; 110:2764-2767.
41. Macmillan ML, Blazar BR, DeFor TE, Wagner JE. Transplantation of ex-vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I-II clinical trial. *Bone Marrow Transplant.* 2009; 43:447-454.
42. Bernardo ME, Ball LM, Cometa AM, et al. Co-infusion of ex vivo-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2011; 46:200-207.
43. Gonzalo-Daganzo R, Regidor C, Martin-Donaire T, et al. Results of a pilot study on the use of third-party donor mesenchymal stromal cells in cord blood transplantation in adults. *Cytotherapy.* 2009; 11:278-288.
44. Meuleman N, Tondreau T, Ahmad I, et al. Infusion of mesenchymal stromal cells can aid hematopoietic recovery following allogeneic hematopoietic stem cell myeloablative transplant: a pilot study. *Stem Cells Dev.* 2009; 18:1247-1252.
45. Undale AH, Westendorf JJ, Yaszemski MJ, Khosla S. Mesenchymal stem cells for bone repair and metabolic bone diseases. *Mayo Clin Proc.* 2009; 84:893-902.
46. Sensebe L, Krampera M, Schrezenmeier H, Bourin P, Giordano R. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang.* 2010; 98:93-107.
47. Mohamadreza Baghaban Eslaminejad, Elham Zomorodian, Fatemeh Bagheri. Mesenchymal Stem Cells in Bone and Cartilage Repair. In: Hossein Baharvand, Nasser Aghdami,

- eds. *Regenerative Medicine and Cell Therapy, Stem Cell Biology and Regenerative Medicine*. Springer; 2013; p. 131-153.
48. Steinert AF, Rackwitz L, Gilbert F, Noth U, Tuan RS. Concise review: the clinical application of mesenchymal stem cells for musculoskeletal regeneration: current status and perspectives. *Stem Cells Transl Med*. 2012; 1:237-247.
 49. Jethva R, Otsuru S, Dominici M, Horwitz EM. Cell therapy for disorders of bone. *Cytotherapy*. 2009; 11:3-17.
 50. Liu Y, Wu J, Zhu Y, Han J. Therapeutic application of mesenchymal stem cells in bone and joint diseases. *Clin Exp Med*. 2012 [Epub ahead of print].
 51. Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, et al. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:1142-1147.
 52. Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*. 2008; 2:169-183.
 53. Vilquin JT, Rosset P. Mesenchymal stem cells in bone and cartilage repair: current status. *Regen Med*. 2006; 1:589-604.
 54. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002; 10:199-206.
 55. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96:10711-10716.
 56. Yang B, El Khoury R, Savitz IS. MSCs for the treatment of stroke, spinal cord injury and traumatic brain injury: from bench work to clinical trials. In: Peiman. Hematti, Armand Keating, editors. *Mesenchymal Stromal Cells: Biology and Clinical Applications, Stem Cell Biology and Regenerative Medicine*. Springer. 2013; p. 617-637.
 57. Neirinckx V, Coste C, Rogister B, Wislet-Gendebien S. Concise review: adult mesenchymal stem cells, adult neural crest stem cells, and therapy of neurological pathologies: a state of play. *Stem Cells Transl Med*. 2013; 2:284-296.
 58. Uccelli A, Laroni A, Freedman MS. Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet Neurol*. 2011; 10:649-656.
 59. Morikawa S, Mabuchi Y, Niibe K, et al. Development of mesenchymal stem cells partially originate from the neural crest. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 379:1114-1119.
 60. Connick P, Kolappan M, Crawley C, et al. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *Lancet Neurol*. 2012; 11:150-156.