



La ricerca di Giulio Cossu per la DMD

Uno degli studi più avanzati e promettenti a livello internazionale nel campo della terapia cellulare per la DMD è quello italiano portato avanti da Giulio Cossu dell'Istituto Scientifico Universitario San Raffaele di Milano. La ricerca è basata sull'utilizzo dei mesoangioblasti, particolari cellule staminali normalmente associate ai vasi sanguigni identificate dal team di Cossu nel 2002 come cellule capaci di rigenerare il tessuto muscolare danneggiato e ripristinare la sua funzionalità. Uno degli aspetti più interessanti dei mesoangioblasti è che se introdotte nella circolazione sanguigna queste cellule sono in grado di migrare fuori dall'endotelio dei vasi e colonizzare i tessuti circostanti.

Gli studi su animali modello

I primi interessanti risultati - pubblicati nel 2003 su Science - sono stati ottenuti in esperimenti condotti sui topi modello per la distrofia muscolare (i **topi mdx**). Il passo successivo del gruppo italiano è stato quello di ripetere gli stessi risultati su un modello animale più complesso quale il cane. Gli esperimenti sono stati condotti sui **Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD)**, cani che presentano una mutazione sul gene della distrofina. Lo studio è stato pubblicato nel 2006 su Nature e il video dei cani distrofici, che una volta trattati con le cellule staminali tornano a camminare, hanno fatto il giro del mondo. In una prima fase sperimentale, i ricercatori hanno estratto i mesoangioblasti dai vasi sanguigni di cani sani, li hanno fatti moltiplicare in coltura, e li hanno iniettati per via intra-arteriosa in cani GRMD. Gli scienziati hanno seguito la migrazione dei mesoangioblasti ed hanno osservato che, una volta usciti dai vasi sanguigni, questi vanno a colonizzare i muscoli danneggiati. Le cellule staminali si fondono con le fibre muscolari esistenti, producono la distrofina sana e rigenerano così il tessuto muscolare. Gli studi di Giulio Cossu hanno avuto un enorme impatto sulla comunità scientifica e sulla comunità dei pazienti DMD.

Ulteriori risultati incoraggianti sono arrivati nel 2007 con l'identificazione delle cellule staminali che nell'uomo corrispondono ai mesoangioblasti già isolati nei topi e nei cani. Una serie di esperimenti, hanno dimostrato che sono cellule facilmente manipolabili in laboratorio e che, se iniettate per via sistemica, ovvero nella circolazione sanguigna, in topi mdx immunosoppressi, sono in grado di colonizzare il tessuto muscolare e di generare una forma corretta di distrofina umana.

Gli studi sull'uomo

Questi ultimi dati hanno creato le basi per la progettazione della prima sperimentazione clinica sull'uomo con trapianto di cellule staminali per la DMD. Lo studio, avviato circa un anno fa, si basa sul **trapianto eterologo** di mesoangioblasti da donatore immunocompatibile - in questo caso un fratello o una sorella - a un paziente DMD. Un primo stadio della sperimentazione, oramai in fase di conclusione, è basato su una serie di minuziose misurazioni della forza e della funzionalità muscolare e sull'analisi del decorso clinico di ogni paziente sull'arco di tempo di un anno. Sono 28 i pazienti DMD che partecipano a questa prima fase e il loro reclutamento è stato reso possibile grazie al Registro Italiano Pazienti DMD/BMD creato da Parent Project Onlus. Tra questi 28 pazienti, 3 bambini (di età compresa tra i 6 e i 9 anni) sono già stati identificati come eleggibili per il trapianto di staminali eterologhe previsto per la primavera prossima.

Ora l'impegno di Giulio Cossu è di riuscire a mettere a punto un sistema in grado di effettuare un **trapianto autologo** di cellule staminali in pazienti DMD. In poche parole, l'obiettivo finale è di riuscire ad utilizzare per il trapianto cellule staminali prelevate dal paziente stesso e "corrette geneticamente" in laboratorio. Superando così le problematiche dovute alla necessità di un donatore immunocompatibile e di una terapia a vita di immunosoppressione.

Sostituire il gene difettoso della distrofina con uno completamente sano è però un'impresa molto ardua per la quale l'intera comunità scientifica internazionale non ha ancora trovato una soluzione. Il gene della distrofina è infatti troppo grande (con 2,4 Mb è il gene più grande contenuto nel nostro DNA) per essere inserito nella maggior parte dei vettori virali usati normalmente per la terapia genica. A questo proposito il team di Giulio Cossu ha pensato ad una strada alternativa e molto innovativa: l'utilizzo di un cromosoma artificiale umano.



Un cromosoma artificiale per la DMD

I primi cromosomi artificiali di mammifero sono stati ideati e messi a punto per la prima volta una decina di anni fa, questi presentano molte delle caratteristiche di un vettore ideale per la terapia genica: replicazione autonoma nella cellula ospite, elevata capacità di clonaggio, possibilità di inserire geni di grandi dimensioni affiancati dai propri elementi genici di controllo e da unità addizionali, minima interferenza con il genoma della cellula ospite. Ma il loro effettivo utilizzo nel campo della terapia genica non si è ancora diffuso per una serie di ostacoli: i cromosomi artificiali sono molecole di DNA di dimensioni notevoli (5-10 Mb) difficilmente manipolabili con le convenzionali tecniche di biologia molecolare, pertanto sia il loro assemblaggio che il loro trasferimento si basano su metodiche lunghe, laboriose e poco efficienti, che richiedono una manualità particolare per cui solo personale esperto riesce ad ottenere buoni risultati.

Il team di Giulio Cossu, in collaborazione con ricercatori giapponesi della Tottori University, sta mettendo a punto un cromosoma artificiale umano costruito *ad hoc* per poter veicolare le sequenze codificanti per la distrofina, affiancate da sequenze regolatorie, allo scopo di “correggere geneticamente” cellule staminali che presentano il gene della distrofina mutato.

Il cromosoma artificiale rappresenta uno strumento molto versatile per la terapia genica e cellulare, al suo interno si possono inserire, o eliminare, a piacimento tutta una serie di unità geniche che servono a regolare finemente la funzione del gene studiato. Ad esempio, oltre al gene della distrofina con le sue sequenze regolatorie, il cromosoma artificiale ideato per la DMD può ospitare geni che rendono immortali le cellule, cioè capaci di differenziarsi continuamente e andare a ripopolare il muscolo dopo il trapianto, oppure MyoD – un gene in grado di aiutare il differenziamento di cellule staminali in muscolo – o anche più copie della stessa sequenza codificante per la distrofina, così ogni cellula trapiantata invece di fare una proteina per unità di tempo ne fa cinque. Siamo di fronte ad un cromosoma “à la carte” come lo definisce lo stesso Giulio Cossu. Tutte queste strategie di ingegneria genetica sono finalizzate a far produrre alla cellula trapiantata alte quantità di distrofina e di poter compensare nel migliore dei modi le cellule difettose presenti nel paziente DMD.

Queste sono le basi per gli studi di terapia genica e cellulare per la DMD avviati dal team di Giulio Cossu e finanziati da Parent Project Onlus per i prossimi tre anni. Gli esperimenti saranno condotti su **topi mdx** (topi modello per la distrofia muscolare): il cromosoma artificiale sarà manipolato in laboratorio e poi inserito in mesoangioblasti prelevati da pazienti DMD, queste cellule “corrette geneticamente” saranno quindi trapiantate in topi mdx immunodeficienti (si usano topi immunodeficienti per ovviare al problema della risposta immunitaria visto che la distrofina prodotta è umana). L’obiettivo del progetto è di riuscire a dimostrare, entro i prossimi tre anni, che cellule staminali umane corrette con il cromosoma artificiale sono in grado di formare distrofina in topi distrofici e di indurre dei benefici a livello della funzionalità muscolare.

Se i risultati si dimostreranno positivi, questo studio permetterà di poter testare, tra alcuni anni, queste cellule anche sull’uomo e puntare così alla tanto ambita sperimentazione clinica di un trapianto autologo di cellule staminali per la DMD.

Un aspetto molto importante di questo approccio è inoltre il fatto che, in teoria, può essere applicato a tutti i pazienti Duchenne e Becker, a prescindere dal tipo di mutazione presente nel gene della distrofina. Parliamo quindi di una terapia “universale” per tutte le mutazioni, dalle più frequenti a quelle meno comuni.

Giulio Cossu è Direttore della Divisione di Medicina Rigenerativa dell’Istituto Scientifico Universitario San Raffaele di Milano e Professore di Istologia all’Università degli Studi di Milano.

Parent Project Onlus finanzia la ricerca di Giulio Cossu dal 1999.

A cura di Francesca Ceradini

Responsabile Scientifico Parent Project Onlus

SEDE LEGALE:
Via Santa Giusta, 50
00050 Aranova (Rm)

SEDE OPERATIVA:
Via Aurelia, 1299
00166 Roma

tel. 06 66182811 – fax 06 66188428
Centro Ascolto Duchenne 800 943 333
partita iva 05203531008 - www.parentproject.it