

Le cellule staminali mesenchimali

Aspetti biologici ed approcci terapeutici

Gli studi pionieristici, iniziati più di trenta anni orsono, hanno consentito di scoprire una interessante popolazione cellulare di derivazione osteo-midollare definita come cellule staminali mesenchimali (CSM). Questo tipo cellulare, utilizzato nell'ultimo decennio in fase pre-clinica e clinica in diversi settori della ricerca biomedica, ha consentito di aprire innovativi filoni di ricerca traslazionale. In questa review si analizzano le basi biologiche delle CSM con l'obiettivo di identificare le loro attuali applicazioni terapeutiche, con particolare attenzione sul loro possibile futuro ruolo in oncologia.

Mesenchymal stem cells

Biological features and therapeutic approaches

Summary

Pioneeristic studies, started thirty years ago, were able to uncover an interesting bone marrow derived cell population named as mesenchymal stem cells (MSC). This cell type, used in the last decade in both pre-clinical and clinical phases in several fields of biomedical sciences, opened up innovative branches of translational research. In this review biological background of the MSC is analyzed with the purpose of identifying their actual therapeutical applications, with a special focus on their possible future role in oncology.

Dominici M, Guarneri V, Cafarelli L, et al. Mesenchymal stem cells. Biological features and therapeutic approach. *Trends Med* 2004; 4(4):341-348.

© 2004 Pharma Project Group srl

Massimo Dominici, Valentina Guarneri, Luigi Cafarelli, Pierfranco Conte

Laboratorio Biologia Cellulare e
Terapie Oncologiche Avanzate
Dipartimento di Oncologia ed
Ematologia
Università di Modena e Reggio Emilia

Key words:
mesenchymal stem cells
plasticity
cell-therapy
cancer Gene-therapy

✉ **Massimo Dominici**
Laboratorio Biologia Cellulare e
Terapie Oncologiche Avanzate
Dipartimento di Oncologia ed
Ematologia
Università di Modena e Reggio Emilia
Via Del Pozzo, 71
41100, Modena
+39 059 422 4019
+39 059 422 4429
dominici.massimo@unimo.it

Nei mammiferi adulti l'ematopoiesi ha luogo nello spazio extravascolare midollare, dove la maturazione cellulare è associata al rilascio di elementi cellulari maturi all'interno del torrente circolatorio attraverso le cellule endoteliali e lo strato avventiziale¹. Nello spazio extravascolare, un fitto network di cellule costituisce il microambiente midollare, in grado di fornire un supporto funzionale e strutturale per l'auto-mantenimento e la differenziazione delle cellule staminali ematopoietiche (CSE)². Gli studi *in vitro* pubblicati da Dexter e coll. negli anni '70 hanno permesso di comprendere come il microambiente midollare possa regolare l'ematopoiesi³. Nelle culture "Dexter-type" o culture a lungo termine si assiste al mante-

nimento per molte settimane dell'emopoiesi grazie alla creazione di uno strato aderente di cellule stromali (CS) in grado di mantenere a lungo vitale la componente emopoietica. In questo strato aderente, rispecchiando quanto possiamo trovare nel microambiente oste-midollare, sono stati individuati 3 principali tipi cellulari: i macrofagi derivati dalla CSE, le cellule endoteliali microvascolari ed i fibroblasti stromali di derivazione mesenchimale⁴.

Da fibroblasto stromale a cellula staminale multipotente

I fibroblasti stromali furono isolati negli anni '70 grazie ai pionieristici studi di Fredreinstein⁵. Egli riscontrò, nella cellularità

midollare, una rara (0,001-0,01%) popolazione di elementi fibroblastoidi allungati in grado di aderire saldamente a supporti in plastica crescendo sotto forma di colonie. Denominando tali unità come CFU-F (unità formanti colonie fibroblastoidi), dimostrò che questi elementi possedevano un elevato potenziale proliferativo senza dimostrare particolari esigenze nutrizionali eccetto per la presenza di siero bovino fetale. In condizioni normali *in vivo* le CFU-F apparivano in fase G₀, mentre *in vivo* dopo 20-60 ore di incubazione entravano in fase S con ciclo mitotico della durata di circa 18h⁶. Queste colonie mostravano una variabilità sia per quanto riguarda le dimensioni che per ciò che riguarda il fenotipo delle cellule costituenti: piccole cellule allungate con grande potenziale proliferativo e grandi cellule quiescenti definite "a lenzuolo"⁷ (figura 1). Inoltre, lo stesso Fredreinstein notò come questi fibroblasti di origine midollare fossero distinti per potenziale differenziativo rispetto, per citare un esempio,

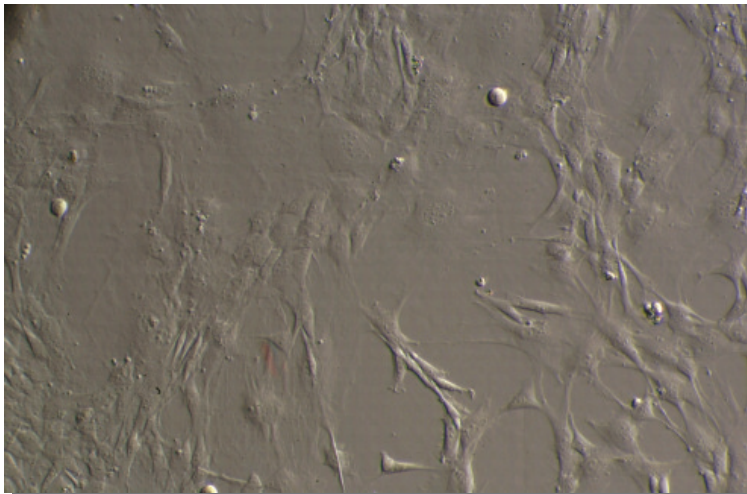
ai fibroblasti cutanei⁸. In particolare, il trapianto di tali cellule in modelli animali all'interno di supporti in ceramica (camere di diffusione) consentiva il differenziamento in senso osteocondrocitario.

Basandosi su questi dati, un gran numero di studiosi ha approfonditamente studiato la natura delle CFU-F^{9,10}, e, partendo dagli anni '80, è stato suggerito come la differenziazione delle cellule mesenchimali possa riflettere in qualche modo il sistema emopoietico¹¹. Questo implica la presenza di cellule staminali parzialmente quiescenti con la capacità di differenziare, in particolari condizioni, in elementi cellulari comprendenti osteoblasti, condrociti, adipociti, mioblasti, cellule neurali¹² (figura 2) e pur tuttavia rimanendo in condizioni di parziale immaturità. Per tali ragioni il termine cellule staminali mesenchimali (CSM) ha progressivamente rimpiazzato la dicitura di CS o di fibroblasti stromali midollari.

La conferma di queste ipotesi deriva dal fatto che le CSM possano essere lasciate in medium

non selettivi per almeno 25-30 passaggi senza che si verificano segni di differenziamento, evento che invece ha luogo in appropriate condizioni in seguito dettagliatamente descritte¹³. Un modello interessante per la differenziazione semi-conservativa delle CSM, molto simile al modello emopoietico, è stato proposto da Colter e collaboratori¹⁴. Tali Autori hanno isolato dallo strato aderente 3 differenti popolazioni, distinte mediante una valutazione citofluorimetrica in base alle dimensioni ed alla complessità intracitoplasmatica. Si tratta di una popolazione di cellule indifferenziate aventi piccole dimensioni in grado di dare origine a cellule parzialmente differenziate che, a loro volta, generano grandi cellule granulate "a lenzuolo" ed allo stesso tempo rigenerano le cellule indifferenziate. Questi dati confermerebbero come le CSM siano per molti versi simili alle CSE, in grado contemporaneamente di differenziare ed auto-mantenere uno stato di immaturità.

Figura 1. Particolare in vitro: Isolamento di cellule staminali mesenchimali umane in coltura da 3 settimane. A partire da questa indifferenziata progenie cellulari è possibile derivare fenotipi più differenziati appartenenti a differenti "lineages". Di nota, l'eteromorfismo cellulare.



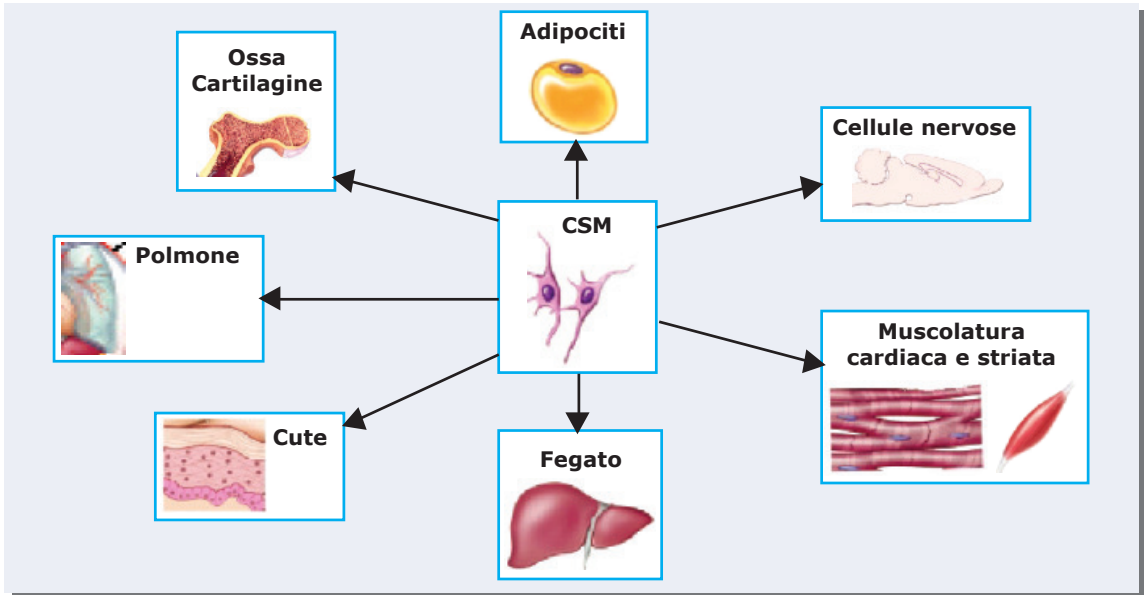
La multi-potenzialità delle CSM

Di seguito vengono precisate le capacità delle CSM di differenziare, in distinte condizioni, verso osteoblasti, condrociti ed adipociti.

Differenziamento osseo

Numerosi dati sperimentali supportano la capacità da parte delle CSM di dare origine a tessuto osseo¹⁵. L'uso di appropriati medium contenenti acido ascorbico, 2-3 glicerol-fosfato e desametasone, inducono il differenziamento di intere popolazioni di CSM in osteoblasti: cellule aderenti rettangolari positive per la fosfatasi alcalina, l'oste-

Figura 2. Rappresentazione schematica della multipotenzialità in termini di differenziamento/attaccamento delle cellule staminali mesenchimali (CSM) in vitro ed in vivo.



ocalcina ed in grado di dare origine a bottoni di mineralizzazione¹⁶. Inoltre, l'utilizzo di specifici fattori di crescita, quali il Bone Morphogenesis Protein (BMP), induce il rapido differenziamento in osteoblasti da parte di CSM indifferenziate sia in vitro che in vivo^{17,18}.

Differenziamento cartilagineo

Un'ulteriore indicazione della plasticità delle CSM deriva dal fatto che tali cellule possano dare origine a condrociti¹⁹. Il percorso di differenziamento tuttavia non pare essere diretto CSM-condrocita ma si ritiene che coinvolga, in fasi intermedie, elementi precursori degli osteoblasti sottolineando la possibilità di un comune precursore osteo-condrocitico. Esistono infatti numerose evidenze in vitro secondo le quali linee cellulari di CSM animali ed umane differenzino nello stesso tempo in condrociti ed osteoblasti nelle stesse condizioni di coltura²⁰. In vivo le CFU-F di ratto trapiantate in camera di diffusione, una

sorta di recipiente poroso in ceramica o metallo innestato nel sottocutaneo di un ricevente, formano nelle prime due settimane tessuto soffice formato da cellule fibroblastoidi altamente proliferanti, nelle ulteriori 2 settimane tessuto condroosteoido ed infine osso e cartilagine²¹.

Differenziamento adipocitario

Le colture a lungo termine di CSM danno origine ad adipociti in presenza di corticosteroidi²². Gli adipociti possiedono una grande plasticità nel loro differenziamento tanto che linee cellulari stromali umane sono in grado di originare sia adipociti che osteoblasti, inoltre è possibile convertire un tipo cellulare in un altro semplicemente modificando le condizioni colturali²³. Ulteriori evidenze in vivo tendono a confermare l'intercambiabilità del fenotipo tra adipociti ed osteoblasti: adipociti midollari trapiantati in camera di diffusione possono perdere la loro capacità di accumulare lipidi trasformandosi in cel-

lule aventi potenziale osteogenico²⁴.

La plasticità delle CSM non deve particolarmente stupire e la sequenza condrogenesi, osteogenesi, stroma pre-emopoietico, emopoiesi ed adipogenesi rappresenta la naturale evoluzione del tessuto osseo e del midollo dalle fasi embrionali e fetali alla vita adulta. Più impressionanti appaiono i dati pubblicati in letteratura inerenti la capacità delle CSM di dare origine a mioblasti e cellule di pertinenza del sistema nervoso centrale.

Differenziamento muscolare

Una somiglianza, almeno per ciò che riguarda il fenotipo tra cellule muscolari e le CSM era stata già descritta all'inizio degli anni '90: le cellule stromali coltivate in "Dexter-type culture" mostrano marcatori propri del differenziamento muscolare: α -actina del muscolo liscio, calponina e miosina²⁵. Tuttavia, studi più recenti hanno mostrato non solo la presenza di antigeni comuni, ma la possibilità che le

CSM possano produrre miotubuli in presenza di molecole ad azione de-metilante, di farmaci anti-micotici e del fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF)^{26,27}. Inoltre, cellule di derivazione midollare trapiantate in un modello murino immunodeficiente (NOD-SCID) con lesioni muscolari indotte, possiedono la capacità di migrare verso le aree di degenerazione muscolare differenziando in mioblasti rigenerando il tessuto lesivo²⁷.

Differenziamento neuronale

L'esistenza di CSM in grado di generare cellule non mesenchimali, ed in particolare neuroni, è stato riportato da due distinti gruppi^{28,29}. Questi autori inducono, nell'80% circa delle CSM, lo sviluppo di un fenotipo caratterizzato dalla positività per antigeni neuro-specifici grazie a media di coltura contenenti bFGF, β -mercaptoetanololo, dimetilsolfossido e idrossi-anisole butilato. Le basi della trasformazione non sono note, tuttavia la differenziazione neuronale è particolarmente rapida e le alterazioni del fenotipo sono visibili a partire dalla quinta ora di incubazione. Interessanti dati in un modello murino confermano questo fenomeno: le CSM iniettate nel ventricolo laterale, raggiungendo l'encefalo, diventano positive per la proteina gliale fibrillare tipica degli astrociti, ovvero possono migrare in regioni ricche di neuroni nella zona corticale differenziando esse stesse in neuroni³⁰.

Sebbene tutti questi dati sperimentali dimostrino la grande abilità nel differenziamento delle CSM, rimangono da chiarire numerosi punti: quale il livello del differenziamento, quali i fattori trascrizionali attivati ed i fattori stimolanti. Inoltre, appare

necessario sottolineare come non è noto se le evidenze osservate in vitro e su modelli animali siano unicamente frutto di modelli sperimentali "forzati" o in qualche modo riflettano eventi fisiologici che possano aver luogo nell'essere umano a scopo terapeutico.

Le evidenze pre-cliniche

La capacità di differenziamento delle CSM in sottotipi cellulari osteo-condrocitari è stata documentata numerose volte in modelli animali ed in protocolli clinici^{31,32}. In tali esperienze la somministrazione locale, allo scopo di correggere difetti scheletrici (distruzioni congenite o acquisite dell'osso o della cartilagine), è stata seguita da un beneficio terapeutico^{33,34}. In maniera più sorprendente studi pre-clinici hanno dimostrato l'abilità delle CSM di attecchire e differenziare in numerosi tessuti/organi in seguito ad iniezione endovenosa (e.v.) sistemica. In numerosi modelli animali, dopo infusione e.v. le cellule sono state riscontrate nella gran parte degli organi. Dai nostri dati, inerenti l'uso di CSM in ambito trapiantologico in un modello pre-clinico, si desume non solo la fattibilità della loro infusione ma la capacità delle CSM di un attecchimento multi-organo: le

cellule infuse sono state riscontrate in polmoni, fegato, muscoli e cute³⁵. Parimenti, altri gruppi utilizzando approcci simili hanno dimostrato un più ampio spettro di attecchimento dopo infusione sistemica: a livello cerebrale, osteo-midollare, osseo, cartilagineo, adipocitario, muscolare scheletrico, muscolare cardiaco, timico, polmonare e cutaneo^{36,37}.

Le esperienze cliniche

I trial clinici sono seguiti ai dati sopra riportati, ed alcuni gruppi di ricerca si sono focalizzati sull'utilizzo delle CSM a scopo clinico in ambito trapiantologico.

La fattibilità della infusione sistemica delle CSM è stata dimostrata sia in caso di trapianto di midollo autologo che allogeneico ed in diversi quadri patologici: nelle emopatie^{38,39}, nei tumori solidi⁴⁰ ed in patologie metaboliche congenite⁴¹.

I risultati del primo trial clinico⁴², in cui cellule modificate geneticamente siano state infuse nel setting allogeneico in bambini affetti da Osteogenesi Imperfetta, hanno confermato non solo che le CSM infuse hanno raggiunto il tessuto bersaglio (l'osso) ma che l'infusione è stata seguita da beneficio.

L'insieme dei risultati di tutti questi trial clinici hanno indica-

Tabella 1. Dati Emersi dai Trials Clinici.

- 1** La criopreservazione non altera in maniera significativa la sopravvivenza e l'espansione delle CSM
- 2** L'infusione delle CSM con le CSE determina un più rapido attecchimento
- 3** L'infusione delle CSM con le CSE determina una riduzione della GVH nel setting allogeneico
- 4** L'attecchimento delle CSM può determinare un beneficio clinico

to che l'infusione delle CSM appare come una procedura sicura, similmente all'infusione delle CSE. In aggiunta alcuni punti fondamentali sono emersi da tali studi (tabella 1): (1) in accordo con i dati di laboratorio la criopreservazione non appare essere in grado di danneggiare le CSM⁴³; (2) l'espansione delle CSM non sembra essere influenzata dal numero di cicli di chemioterapia a cui i pazienti sono stati precedentemente sottoposti, sebbene tale dato non sia stato confermato in tutti gli studi⁴⁴; (3) l'infusione delle CSM con le CSE sembra essere associata ad un migliore e più rapido attecchimento⁴⁰ andando anche a ridurre l'intensità della graft-versus-host (GVH); (4) l'attecchimento delle CSM del donatore nel ricevente è seguita ad un beneficio clinico, almeno per patologie a carico dei tessuti di origine mesenchimale ed in particolare per l'osso⁴².

L'uso delle CSM per scopi di terapia cellulare e/o genica si è dimostrato avere numerosi vantaggi rispetto ad altri tipi cellulari (CSE, cellule staminali di pertinenza del sistema nervoso centrale e cellule embrionali umane). I vantaggi¹² sono riportati nella tabella 2, in particolare si tiene a sottolineare come l'utilizzo delle CSM non implichi questioni etiche legate, ad esempio, all'impiego delle cellule di derivazione cerebrale o delle cellule ottenute da embrioni⁴⁵.

Le CSM come veicolo per terapia genica

Per quanto riportato nelle tabelle 1 e 2, le CSM modificate geneticamente sono state testate in modelli in vitro ed in vivo di terapia genica. Numerosi gruppi hanno indotto, mediante vettori virali, la produzione di mole-

Tabella 2. Vantaggi inerenti l'uso delle CSM per terapie cellulari e geniche.

- 1** Efficiente e rapida espansione ex vivo senza particolari esigenze nutrizionali
- 2** Possibilità sia di una infusione locale che sistemica
- 3** Elevata multipotenzialità sia in vitro che in vivo anche a seguito di colture protratte
- 4** Possibilità di un elevato livello di trasduzione mediante differenti tecniche (prevalentemente virus-mediate)
- 5** Le CSM sono considerate immunologicamente neutrali non possedendo complessi maggiori di istocompatibilità di classe II
- 6** L'uso di CSM non solleva questioni etiche paragonabili all'uso delle cellule embrionali

cole normalmente non secrete dalle CSM.

Alcuni autori hanno riportato, nel tentativo di migliorare l'attecchimento post-trapianto delle CSE, come le CSM possano produrre fattori stimolanti l'ematopoiesi (Interleukine 1 α ⁴⁶ e 3⁴⁷) consentendo idealmente un tempo di attecchimento molto rapido qualora co-infuse. Altri autori, in ambito ortopedico, si sono impegnati cercando di rigenerare il tessuto osseo inoculando CSM trasformate per la produzione di una molecola, detta Bone Morphogenic Protein-2 (BMP-2), avente la forte capacità di trasformare le stesse cellule in cellule osteo-produttori²³. Altri ancora nel cercare di correggere l'emofilia A e B, hanno dimostrato come sia possibile trasformare le CSM in un reservoir di fattore VIII e IX da infonderle in modelli animali consentendo, seppure in maniera transiente, il rialzo dei valori serici dei due fattori carenti^{48,49}. Tutte le precedenti considerazioni giustificano il grande utilizzo delle CSM sia per terapie cellulari rigenerative (tese a rigenerare tessuti danneggiati da patologie congenite o acquisite)

sia per scopi di terapia genica (fornire geni assenti o ipo-funzionanti per disordini congeniti)⁵⁰. Tuttavia, nonostante le grandi potenzialità in termini di terapia cellulare/genica, le CSM hanno avuto un ruolo marginale in campo oncologico sperimentale.

Il selettivo ed effettivo killing sulle cellule patologiche deve essere una *conditio sine qua non* per tutte le applicazioni di terapia genica antitumorale e ciò deve necessariamente basarsi su di un homing selettivo delle cellule infuse verso la massa neoplastica. Tale capacità di raggiungere il sito "bersaglio" sembra essere mediata dalle proprietà intrinseche al tumore e/o da uno specifico tropismo per il sito tumorale da parte del tipo cellulare selezionato come vettore.

Come sottolineato in precedenza, l'homing delle CSM dopo infusione sistemica o locale è stato testato su diversi modelli animali mentre sono scarse le informazioni sulla distribuzione in vivo e, soprattutto, sulla sopravvivenza nell'uomo^{35,36,42}. E' possibile tuttavia ipotizzare che tale capacità possa essere sfruttata per raggiungere in maniera

selettiva le cellule tumorali a scopo terapeutico.

I dati recenti, derivanti da esperienze su modelli animali³⁶, hanno dimostrato che le condizioni caratterizzate da un rimodellamento dei tessuti possano produrre i segnali di chemotassi necessari alla sopravvivenza e alla proliferazione delle CSM somministrate per via sistemica. Una massa di cellule neoplastiche in crescita rappresenta senza dubbio una condizione ad un elevato turnover cellulare legato non solo alla proliferazione tumorale ma necessariamente ad una contestuale reazione stromale⁵¹. Possiamo quindi ipotizzare che tale rimodellamento tessutale sia in grado di determinare un richiamo chemotattico per le CSM eventualmente infuse e.v.

A conferma di tale teoria, Stucky e coll⁵² hanno valutato le interazioni tra CSM e cellule di melanoma in modelli animali. Questi autori hanno dimostrato che co-iniettando sottocute CSM e cellule di melanoma, una significativa porzione di fibroblasti di derivazione dalle CSM umane si incorporava nello stroma tumorale. Tali fibroblasti derivati dalle CSM hanno non solo dimostrato la possibilità di sopravvivere nei pressi nel tumore ma di conservare una capacità replicativa. L'interazione tumore-CSM è stata, dagli stessi autori, dimostrata a seguito di infusione sistemica in modelli animali con metastasi polmonari da melanoma. Le CSM iniettate e.v. hanno dimostrato, anche in questo caso, sia la proprietà di migrare selettivamente nei siti di malattia che la capacità di replicarsi. Questi dati suggeriscono

quindi che il microambiente tumorale, apparentemente più del tessuto normale, sembra in grado di consentire la sopravvivenza delle CSM e la loro incorporazione nell'alterato stroma peritumorale.

Altri approcci di terapia genica anti-tumorale si sono basati sulla terapia cosiddetta "suicida". Essa impiega la trasfezione cellulare di geni responsabili della produzione a livello locale di metaboliti tossici⁵³. Il classico esempio è l'inserimento, nelle cellule tumorali stesse o nei vettori cellulari aventi la proprietà di raggiungere la massa tumorale, di geni in grado di trasformare un pro-farmaco a farmaco avente una potente azione citotossica. Il vantaggio di tale approccio consiste nel concentrare l'azione nociva del principio farmacologico laddove ve ne è bisogno: nei pressi del tumore. Inoltre, un aspetto molto importante di questo tipo di strategia consiste anche nella potenzialità di esercitare questi effetti a livello delle cellule viciniori non trasfettate, attraverso il così detto "bystander killing effect".

Appare quindi chiaro, dato il tropismo delle cellule mesenchimali per il tumore, che in futuro potremmo modificare con questi geni suicidi le CSM ed infonderle innescando un meccanismo di citotossicità peri-tumorale "focalizzata". In tal senso esistono dati preliminari mostranti che le CSM, attraverso il meccanismo di attivazione di profarmaci, siano in grado di indurre in vitro un effetto citolitico su linee cellulari tumorali⁵⁴.

Un'altra importante prospettiva consiste nell'utilizzo delle CSM

come vettori per il diretto rilascio di virus oncolitici nel sito tumorale: questa strategia sfrutta la combinazione dell'effetto citopatico diretto intrinseco dei virus con una specificità verso le cellule tumorali⁵⁵. A questo scopo è necessario che le cellule utilizzate come vettore siano in grado di supportare un intero ciclo di replicazione virale, dando quindi origine ad una seconda generazione di particelle virali. In tal senso le informazioni appaiono scarse, tuttavia Pereboeva e collaboratori hanno dimostrato come le CSM siano in grado di supportare una replicazione virale completa, dando origine a particelle virali in grado di determinare un effetto citolitico su linee cellulari tumorali⁵⁴.

Per concludere, sebbene queste indicazioni all'utilizzo delle CSM in oncologia siano per molti versi preliminari, fanno intravedere le loro possibili applicazioni in oncologia. In questo ambito le CSM potrebbero trasformarsi da ideali mezzi per rigenerare tessuti danneggiati o congenitamente ipofunzionanti in una sorta di proiettili in grado di raggiungere specificatamente le cellule tumorali inducendone la morte.

L'uso delle CSM, accanto ai nuovi aspetti terapeutici farmacologici (anticorpi monoclonali, inibitori della tirosina chinasi etc.) e cellulo-mediati (immunoterapia, vaccinoterapia), potrebbe arricchire il promettente filone di ricerca delle terapie anti-tumorali mirate consentendo un approccio sempre più efficace e specifico per patologie tuttora gravate da un elevato grado di morbilità e mortalità. **TiM**

Bibliografia

1. **Tavassoli M.** The marrow blood barrier. *Exp Hematol* 1979; 91:297-302.
2. **Lichtman MA.** The ultrastructure of hemopoietic environment of the marrow: a review. *Exp. Hematol* 1981; 9:391-410.
3. **Dexter TM.** Stromal cell associated haematopoiesis. *J Cell Physiol* 1982; 1(Suppl):87-94.
4. **Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, et al.** Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cell. *J Cell Physiol* 1998; 176:57-66.
5. **Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, et al.** Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. *Exp Hematol* 1974; 2:83-92.
6. **Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsnik NV, et al.** Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. *Transplantation*. 1974; 17:331-340.
7. **Mets T, Verdonk G.** *In vitro* aging of human bone marrow derived stromal cells. *Mech Ageing Dev* 1981; 16:81-89.
8. **Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV.** Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987; 20:263-272.
9. **Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, et al.** Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 1980; 56:289-301.
10. **Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher RE, et al.** Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. *Exp Hematol* 1985; 13:237-243.
11. **Owen M.** Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 1988; 10:63-76.
12. **Dominici M, Hofmann T, Horwitz EM.** Bone marrow mesenchymal cells: biological properties and clinical applications. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 2001; 15:28-37.
13. **Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE.** Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997; 64:278-294.
14. **Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, et al.** Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:3213-3218.
15. **Beresford JN.** Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop* 1989; 240:270-280.
16. **Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, et al.** Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. *J Cell Biochem* 1997; 64:295-312.
17. **Kataoka H, Urist MR.** Transplant of bone marrow and muscle-derived connective tissue cultures in diffusion chambers for bioassay of bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 1993; 286:262-270.
18. **Chen D, Ji X, Harris MA, et al.** Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol* 1998; 142:295-305.
19. **Lennon DP, Haynesworth SE, Young RG, et al.** A chemically defined medium supports *in vitro* proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 1995; 219:211-222.
20. **Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE.** Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol* 1988; 106:2139-2151.
21. **Fang J, Hall BK.** Chondrogenic cell differentiation from membrane bone periosteum. *Anat Embryol (Berl)* 1997; 196:349-362.
22. **Chen ZZ, Van Bockstaele DR, Buysens N, et al.** Stromal populations and fibrosis in human long-term bone marrow cultures. *Leukemia* 1991; 5:772-781.
23. **Hughton A, Oyajobi BO, Foster GA, et al.** Immortalization of human marrow stromal cells by retroviral transduction with a temperature sensitive oncogene: identification of bipotential precursor cells capable of directed differentiation to either an osteoblast or adipocyte phenotype. *Bone*. 1998; 22:7-16.
24. **Bennett JH, Joyner CJ, Triffitt JT, et al.** Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci* 1991; 99:131-139.
25. **Galmiche MC, Koteliansky VE, Briere J, et al.** Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood* 1993; 82:66-76.
26. **Wakitani S, Saito T, Caplan AI.** Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995; 18:1417-1426.
27. **Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al.** Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279:1528-1530.
28. **Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al.** Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61:364-370.
29. **Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al.** Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol* 2000; 164:247-256.
30. **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 USA* 1999; 96:10711-10716.
31. **Moutsatsos IK, Turgeman G, Zhou S, et al.** Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration. *Mol Ther* 2001; 3:449-461.
32. **Kon E, Muraglia A, Corsi A,**

- et al.* Autologous bone marrow stromal cells loaded into porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* 20005; 49:328-337.
33. **Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, et al.** Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001; 344:385-386.
 34. **Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, et al.** Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10:199-206.
 35. **Mihara K, C Imai, E Coustan-Smith et al.** Development and functional characterization of human bone marrow mesenchymal cell immortalized by enforced expression of telomerase. *Br J Haematol* 2003; 120:846-849.
 36. **Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, et al.** Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000; 6:1282-1286.
 37. **Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, et al.** Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol* 2001; 29:244-255.
 38. **Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL et al.** Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16:557-564.
 39. **Lee ST, Jang JH, Cheong JW, et al.** Treatment of high-risk acute myelogenous leukaemia by myeloablative chemoradiotherapy followed by co-infusion of T cell-depleted haematopoietic stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells from a related donor with one fully mismatched human leucocyte antigen haplotype. *Br J Haematol* 2002; 118:1128-1131.
 40. **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.
 41. **Koc ON, Day J, Nieder M, et al.** Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant* 2002; 30:215-222.
 42. **Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, et al.** Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8932-8937.
 43. **Nicol A, Nieda M, Donaldson C, et al.** Cryopreserved human bone marrow stroma is fully functional *in vitro*. *Br J Haematol* 1996; 94:258-265.
 44. **Carlo-Stella C, Tabilio A, Regazzi E, et al.** Effect of chemotherapy for acute myelogenous leukemia on hematopoietic and fibroblast marrow progenitors. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20:465-471.
 45. **Dresser R.** Ethical issues in embryonic stem cell research. *JAMA* 2001; 285:1439-1440.
 46. **de Revel T, Becard N, Sorg T, et al.** Retroviral interleukin 1alpha gene transfer in bone marrow stromal cells in a primate model: induction of myelopoiesis stimulation. *Br J Haematol* 2002; 118:875-884.
 47. **Nolta JA, Hanley MB, Kohn DB.** Sustained human hematopoiesis in immunodeficient mice by cotransplantation of marrow stroma expressing human interleukin-3: analysis of gene transduction of long-lived progenitors. *Blood* 1994; 83:3041-3051.
 48. **Chuah MK, Van Damme A, Zwinnen H, et al.** Long-term persistence of human bone marrow stromal cells transduced with factor VIII-retroviral vectors and transient production of therapeutic levels of human factor VIII in nonmyeloablated immunodeficient mice. *Hum Gene Ther* 2000; 11:729-738.
 49. **Krebsbach PH, Zhang K, Mallick AK, et al.** Bone marrow stromal cells as a genetic platform for systemic delivery of therapeutic proteins *in vivo*: human factor IX model. *J Gene Med* 2003; 5:11-17.
 50. **Horwitz EM, Hofmann TJ, Garlits JE, et al.** On the development of cell therapy for genetic disorders. *Cytotherapy* 2002; 4:511-512.
 51. **Hasebe T, Sasaki S, Imoto S, et al.** Highly proliferative fibroblasts forming fibrotic focus govern metastasis of invasive ductal carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 2001; 14:325-337.
 52. **Studený M, Marini FC, Champlin RE, et al.** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 2002; 62:3603-3608.
 53. **Rancourt C, Robertson MW 3rd, Wang M, et al.** Endothelial cell vehicles for delivery of cytotoxic genes as a gene therapy approach for carcinoma of the ovary. *Clin Cancer Res* 1998; 4:265-270.
 54. **Pereboeva L, Komarova S, Mikheeva G, et al.** Approaches to utilize Mesenchymal Progenitor Cells as Cellular Vehicles. *Stem cells* 2003; 21:389-404.
 55. **Kruyt FA, Curiel DT.** Toward a new generation of conditionally replicating adenoviruses: pairing tumor selectivity with maximal oncolysis. *Hum Gene Ther* 2002; 13:485-495.