Mezenchymální kmenové buňky a léčba diabetu 1. typu

Pavla Boháčová, Vladimír Holář

Oddělení transplantční imunologie Ústavu experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Praha

Souhrn

Diabetes 1. typu představuje závažné onemocnění způsobené autoimunitní destrukcí slinivkových B-buněk produkujících inzulin. Substituční léčbou inzulinem není možné nahradit okamžitou a citlivou regulaci hladiny glukózy v krvi, která je zajišťována B-buňkami u zdravé populace. Transplantace slinivky nebo Langerhansových ostrůvků je omezena nedostatečným množstvím dárců a komplikacemi souvisejícími s transplantací. Proto jsou hledány nové přístupy léčby, mezi něž patří i využití mezenchymálních kmenových buněk (mesenchymal stem cells – MSC), které představují potenciálně velmi slibnou buněčnou terapii tohoto typu diabetu. MSC mají významný vliv na regulaci imunitního systému, jsou schopné produkovat řadu cytokinů a růstových faktorů a diferencovat se do odlišných buněčných typů. V kontextu diabetu 1. typu se mohou MSC diferencovat do buněk produkujících inzulin, pomocí produkce trofických a růstových faktorů podpořit regeneraci zachovaných B-buněk slinivky nebo se mohou podílet na potlačení autoimunitních reakcí proti B-buňkám. V tomto přehledném článku jsou popsány mechanismy buněčné terapie pomocí MSC a její případná omezení.

Klíčová slova: autoimunitní reakce – diabetes 1. typu – diferenciace – mezenchymální kmenové buňky

Mesenchymal stem cells and type 1 diabetes treatment

Summary

Type 1 diabetes represents a serious disease which is caused by autoimmune destruction of insulin-producing B cells in the pancreas. Administration of exogenous insulin cannot replace sensitive and gentle regulation of blood glucose levels that is established by B cells in healthy individuals. Pancreas or islet transplantation is limited by a shortage of donor pancreas and by complications associated with transplantations. For those reasons, new approaches of treatment are being searched, the using of mesenchymal stem cells (MSCs) envisions a promising tool for cell-based therapy of type 1 diabetes. MSCs have a significant impact on the regulation of the immune system, are a potent source of various cytokines and growth factors and manifest multilineage differentiation abilities. In context of type 1 diabetes, MSCs can transdifferentiate into insulin-producing cells, support the regeneration of residual B cells by production of trophic and growth factors or participate in the suppression of the autoimmune reaction against B cells. This review is focused on perspectives and mechanisms of MSC-based therapy and its limitations.

Key words: autoimmune reaction – differentiation – mesenchymal stem cells – type 1 diabetes

Úvod

Diabetes 1. typu (DM1T) představuje chronické autoimunitní onemocnění, které vede k destrukci B-buněk produkujících inzulin. Jeho patologie je spojena s defektní aktivitou buněk prezentujících antigen, nejspíše dendritických buněk, které pohlty části odumřelých B-buněk a patologicky se aktivují, nejčastěji v souvislosti s virovými infekcemi. Ve spádových uzlinách slinivky tyto patologicky aktivované dendritické buňky prezentují antigeny T-lymfocytům. Malá část autoreaktivních

T-lymfocytů, které unikly eliminaci v brzlíku, je aktivována antigeny B-buněk na zralých dendritických buňkách. Následně aktivované autoreaktivní T-lymfocyty nevratně poškodí B-buňky [1,2]. Základní léčba DM1T zahrnuje injekční aplikaci inzulinu pacientům, tato terapie ale nezabrání dlouhodobým komplikacím způsobeným zvýšenou hladinou glukózy v krvi. Mezi tyto obtíže patří zejména poškození vaskularizace tkání, diabetická retinopatie, selhání ledvin nebo zhoršené hojení ran [3]. Alternativou pro substituční léčbu inzulinem je transplan-

tace slinivky, případně Langerhansových ostrůvků. Tento přístup je ale omezen nedostatkem vhodných dárců a nutností dlouhodobého podávání imunosupresivních léků po transplantaci. Jeho použití umožňuje léčbu pouze pacientů s dobře kontrolovanou hladinou glukózy v krvi [4,5]. Z těchto důvodů použití mezenchymálních kmenových buněk (mesenchymal stem cells – MSC) představuje slibnou alternativní možnost terapie DM1T, ale i řady dalších autoimunitních onemocnění.

Mezenchymální kmenové buňky

MSC jsou stromální kmenové buňky přítomné i v dospělém organismu, které se vyznačují schopností sebeobnovy a diferenciace do odlišných buněčných linií [6]. MSC byly poprvé popsány v roce 1966 jako buňky s osteogenním potenciálem získané z kostní dřeně [7]. Později bylo ukázáno, že MSC je možné získat z různorodé škály tkání, mezi které patří např. kostní dřeň, pupečnicková krev a tuková tkáň, ale i svaly nebo synoviální membrána [8].

Dosud nebyl nalezen jedinečný povrchový znak pro MSC. Mohou však být charakterizovány kombinací exprese pozitivních znaků, mezi něž patří molekuly CD44, CD90 a CD105, a naopak nepřítomností leukocytárních znaků CD34 nebo CD45. Mezi další vlastnosti MSC patří také schopnost diferenciace v adipocyty, osteocyty, chondrocyty a další buněčné typy [8,9].

Kromě diferencičního potenciálu MSC disponují i rozsáhlými imunomodulačními vlastnostmi, kterými mohou ovlivňovat jak přirozenou, tak adaptivní složku imunitního systému. MSC působí na imunitní buňky produkcí řady cytokinů a imunologicky aktivních molekul, ale také přímým buněčným kontaktem. MSC mohou produkovat imuno-

regulační molekuly konstitutivně, nebo až jako reakci na setkání se s určitými signály, jako např. vystavení zánětlivému prostředí. Odlišné vnější stimuly mají vliv na reaktivitu MSC. Prokázali jsme, že mikroprostředí MSC hraje významnou roli v imunoregulačních schopnostech MSC a v mechanismech, kterými MSC působí. Např. v závislosti na prostředí se může lišit mechanismus účinku MSC, kterým odpovídají na stejný stimul [10]. Imunomodulační účinky MSC jsou zprostředkovány celou řadou faktorů, imunomodulačních molekul a enzymů, mezi něž patří transformující růstový faktor β , interleukin 6 (IL6), cyklooxygenáza 2 nebo indolamin 2,3-dioxygenáza [11]. Dále MSC produkují široké spektrum trofických a růstových faktorů, které přispívají k regeneraci poškozené tkáně. Příkladem těchto faktorů je růstový faktor hepatocytů, vasculární endoteliální růstový faktor, faktor podobný inzulínu 1, bazický růstový faktor fibroblastů a řada dalších [12].

Působení MSC při léčbě DM1T

Podání MSC může k léčbě DM1T přispět různými způsoby a odlišnými mechanismy, jak znázorňuje schéma. MSC mohou přispět ke zmírnění diabetu snížením hladiny glukózy v krvi přímou diferenciací na buňky produkující inzulín nebo mohou ovlivňovat slinivkové mikroprostředí tak, že dojde k vnitřní obnově B-buněk. Dále MSC mohou svými imunomodulačními vlastnostmi působit na potlačení autoimunitní reakce, což také vede ke zmírnění diabetu.

Bylo ukázáno, že v reakci na poškození slinivky jsou lidské MSC po aplikaci diabetickým myším schopné diferencovat se do buněk produkujících inzulín a vyrovnávat hladinu glukózy v krvi [13]. Lidské MSC je možné diferencovat se do buněk produkujících inzulín také in

Schéma. Znázornění mechanismů, kterými mohou MSC přispívat k léčbě DM1T

vitro při použití slinivkových diferenciálních faktorů. Bylo popsáno několik diferenciálních protokolů odlišujících se délkou inkubace i směsí použitých faktorů. Při použití jednoho z možných protokolů bylo prokázáno, že diferenciované MSC jsou schopné tvořit shluky podobné slinivkovým ostrůvkům a dlouhodobě produkovat inzulin. Transplantace těchto buněk do břišní dutiny myši s experimentálním diabetem vyvolala snížení hladiny glukózy v krvi těchto zvířat [14]. Alternativním přístupem pro diferenciaci MSC je použití genového inženýrství. Využitím neintegrujícího lentivirového vektoru byla u lidských MSC navozena exprese transkripčního faktoru PDX1, který má esenciální roli ve vývoji B-buněk a jejich přežívání. Po aplikaci tyto buňky udržovaly stabilně 2krát nižší hladinu glukózy v krvi u potkanů s diabetem navozeným pomocí roztoku aloxanu, který je toxický mimo jiné pro B-buňky pankreatu, ve srovnání s neléčenými zvířaty po dobu několika měsíců [15,16]. Obdobou pro využití virových vektorů je použití technologie CRISPR využívající prokaryotický obranný systém proti cizorodé DNA, díky čemuž je možné editovat genetickou informaci a přímo diferencovat buňky změnou jejich expresního profilu. Pomocí tohoto přístupu bylo docíleno transkripce inzulinu v lidských fibroblastech [17]. Nicméně, pozitivní vliv na DM1T při transplantaci MCS není nejspíše dán pouze přímou diferenciací MSC na buňky produkující inzulin, jelikož nejsou schopné se diferencovat v plně funkční B-buňky. Pravděpodobněji se jeví možnost, že by MSC mohly snižovat hladinu glukózy v krvi, a tím mírnit diabetes pomocí produkce trofických a růstových faktorů, které mohou mít přímý i nepřímý vliv na regeneraci B-buněk. Např. u myši s diabetem navozeným pomocí streptozotocinu vedla transplantace kostní dřeně k vyrovnání hladiny glukózy v krvi a částečně k obnovení počtu a velikosti Langerhansových ostrůvků bez diferenciace MSC [18]. Ke snížení hladiny glukózy a částečnému obnovení velikosti a počtu ostrůvků B-buněk u diabetických myši došlo i po podání kondicionovaného média z kultury MSC, bez nutnosti aplikace samotných MSC. Zmnožení B-buněk souviselo s aktivitou kinázy Akt, na jejíž zvýšenou aktivitu měly vliv právě faktory produkované MSC [19].

MSC mají také výrazný vliv na imunitní systém, v němž regulují jeho jak přirozené, tak adaptivní složky [11]. V kontextu DM1T byl popsán účinek MCS na potlačení autoimunitní reakce namířené proti B-buňkám. MSC potlačovaly proliferaci autoreaktivních T-lymfocytů. Dále přispívaly k přesmyku Th1 typu imunitní odpovědi na Th2 odpověď pomocí potlačení produkce interferonu γ a zvýšení produkce IL4 a IL10. MSC byly také schopné podpořit vývoj regulačních FoxP3 pozitivních T-lymfocytů, které tlumily autoimunitní reakce, čímž bylo omezeno další poškození B-buněk [20,21].

Omezení použití MCS v klinické praxi a jejich bezpečnost

Širší použití MSC pro klinickou praxi je v současnosti stále omezeno několika problémy. Základní otázkou použití

MSC je jejich bezpečnost. U myši bylo ukázáno, že při dlouhodobě trvajících pasážích MSC dochází k chromozomovým aberacím, které mohou po jejich aplikaci vést až ke vzniku sarkomu [22]. U prasečího modelu bylo prokázáno, že zvyšující se počet pasáží vede k zhoršenému diferenciálnímu potenciálu MSC, chromozomové změny ale prokázány nebyly [23]. Stabilita lidských MSC byla doložena minimálně do 12. pasáže a podání těchto MSC imunodeficientním myším nevedlo k tvorbě nádorů ani při vysokých dávkách MSC [24]. Stabilita MSC se proto může lišit mezi různými druhy a je nutné zabývat se stálostí a bezpečností přímo lidských MSC bez možnosti generalizování znalostí z jiných zvířecích modelů.

Další důležitou otázkou související s použitím MSC je volba mezi použitím autologních nebo alogenních buněk. Alogenní transplantace vyvolávají imunitní reakce proti štěpu. Je proto nutné zabývat se otázkou, zda jsou MSC dostatečně imunitně privilegované buňky nebo podání alogenních MSC vyžaduje současnou aplikaci imunosupresivní léčby [25]. Naopak u autologních buněk izolovaných z pacientů existuje riziko, že budou mít sníženou schopnost potlačovat autoimunitní reakci. Na druhou stranu bylo ukázáno, že se MSC izolované z diabetických pacientů diferencují do buněk podobných B-buňkám snadněji než MSC zdravých dárců [26].

Před rutinním používáním MSC je dále nutné zaměřit se na způsoby jejich podání. Systémové podání MSC představuje nejjednodušší možnost jejich aplikace, nicméně je nutné charakterizovat jejich následnou distribuci v rámci organismu a jejich schopnost putovat do místa poškození. U myšího modelu jsme prokázali, že myši MSC jsou schopné po systémovém podání dočasné žíly specificky migrovat do poškozeného oka [27]. Přesto je nezbytné testovat tyto schopnosti u lidských MSC a v lidském organismu.

Aktuální klinické studie zaměřené na léčbu diabetes mellitus pomocí MSC

Podle webové stránky ClinicalTrials.gov, která se celosvětově shromažďuje informace o klinických studiích, probíhalo a probíhá více než 700 klinických studií zaměřených na použití MSC v humánní medicíně. Z těchto studií se jich 46 vztahuje k diabetu 1. nebo 2. typu a jejich komplikacím, jako je např. vaskulární poškození a s tím související ischemie končetin a diabetická noha. Aktuálně probíhá 7 klinických studií zaměřených na využití MSC v léčbě DM1T, přičemž pouze jedna je prováděna v Evropě. Tato studie se zabývá současnou transplantací ledvin, B-buněk a autologních MSC. Hlavním cílem je srovnání bezpečnosti a účinnosti funkce B-buněk při různém způsobu jejich aplikace a vlivu současného podání autologních MSC na funkčnost a udržení B-buněk po transplantaci. Ostatních 6 klinických studií je prováděno mimo Evropu a zabývají se aplikací alogenních buněk, přičemž zastoupení ve využití MSC z kostní dřeně, tukové tkáně a pupečnickové krve je shodné. Primární léčbě DM1T se věnují 3 z prováděných studií, ostatní se zabývají využitím MSC pro zmenšení jeho

komplikací. Systémově jsou MSC podávány ve 4 případech, dále je testována možnost intradermálního a intramuskulárního podání a aplikace přímo do ložiska rány chronických vředů u diabetické nohy. Co se týká dávky podávaných MSC, běžně se používá pouze jedna dávka v rozmezí 2 milionů MSC na osobu až 10 milionů buněk na kilogram váhy.

Závěr

Využití MSC představuje nový přístup v léčbě DM1T i některých dalších autoimunitních onemocnění. Díky svým jedinečným vlastnostem, mezi které patří produkce řady cytokinů, růstových faktorů i schopnost diferencovat se v odlišné buněčné typy, využití MSC představuje velmi slibnou terapii i pro pacienty s DM1T. Pro běžné použití MSC v klinické praxi je ale nezbytné zodpovědět řadu otázek a omezení, která se v současnosti vztahují k aplikaci MSC pro léčebné použití.

Tato práce byla podpořena projektem NPU LO1309 z Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Literatura

- Mathis D, Vence L, Benoist C. Beta-cell death during progression to diabetes. *Nature* 2001; 414(6865): 792–798. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/414792a>>.
- Vrlíkova D, Mokan M. Diabetes mellitus 1. typu a autoimunita. *Vnitř Lék* 2005; 51(11): 1297–1302.
- Ezquer M, Arango-Rodríguez M, Giraud-Billoud M et al. Mesenchymal stem cell therapy in type 1 diabetes mellitus and its main complications: from experimental findings to clinical practice. *J Stem Cell Res Ther* 2014; 4(8): 227. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.4172/2157-7633.1000227>>.
- [Health Quality Ontario]. Pancreas islet transplantation for patients with type 1 diabetes mellitus: a clinical evidence review. *Ont Health Technol Assess Ser* 2015; 15(16): 1–84.
- Saudek F, Gírmán P, Lipar K et al. Transplantace pankreatu: současný stav a výhledy do budoucna. *Vnitř Lék* 2015; 61(7): 731–737.
- Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 2011; 20(1): 5–14. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.3727/096368910X>>.
- Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16(3): 381–390.
- Kobolák J, Dinnyes A, Memic A et al. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods* 2016; 99: 62–68. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.09.016>>.
- Machado C de V, Telles PD, Nascimento IL. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2013; 35(1): 62–67. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.5581/1516-8484.20130017>>.
- Holan V, Hermankova B, Boháčová P et al. Distinct immunoregulatory mechanisms in mesenchymal stem cells: role of the cytokine environment. *Stem Cell Rev* 2016; 12(6): 654–663. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12015-016-9688-y>>.
- Pistoia V, Raffaghello L. Mesenchymal stromal cells and autoimmunity. *Int Immunol* 2017; 29(2): 49–58. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxx008>>.
- Gu W, Hong X, Potter C et al. Mesenchymal stem cells and vascular regeneration. *Microcirculation* 2017; 24(1): e12324. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/micc.12324>>.
- Koblas T, Zacharovova K, Berkova Z et al. In vivo differentiation of human umbilical cord blood-derived cells into insulin-producing beta cells. *Folia Biol (Praha)* 2009; 55(6): 224–232.
- Chandra V, Swetha G, Muthyala S et al. Islet-like cell aggregates generated from human adipose tissue derived stem cells ameliorate experimental diabetes in mice. *PLoS One* 2011; 6(6): e20615. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0020615>>.
- Boroujeni ZN, Aleyasin A. Insulin producing cells established using non-integrated lentiviral vector harboring PDX1 gene. *World J Stem Cells* 2013; 5(4): 217–228. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.4252/wjsc.v5.i4.217>>.
- King A. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol* 2012; 166(3): 877–894. <<http://dx.doi.org/10.1111/1/j.1476-5381.2012.01911.x>>.
- Gerace D, Martiniello-Wilks R, Nassif NT et al. CRISPR-targeted genome editing of mesenchymal stem cell-derived therapies for type 1 diabetes: a path to clinical success? *Stem Cell Res Ther* 2017; 8(1): 62. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13287-017-0511-8>>.
- Hasegawa Y, Ogihara T, Yamada T et al. Bone marrow (BM) transplantation promotes beta-cell regeneration after acute injury through BM cell mobilization. *Endocrinology* 2007; 148(5): 2006–2015. <<http://dx.doi.org/10.1210/en.2006-1351>>.
- Gao X, Song L, Shen K et al. Bone marrow mesenchymal stem cells promote the repair of islets from diabetic mice through paracrine actions. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 388(1): 41–50. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2014.03.004>>.
- Fiorina P, Jurewicz M, Augello A et al. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J Immunol* 2009; 183(2): 993–1004. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0900803>>.
- Madec AM, Mallone R, Afonso G et al. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia* 2009; 52(7): 1391–1399. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00125-009-1374-z>>.
- Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2007; 25(2): 371–379. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2005-0620>>.
- Vacanti V, Kong E, Suzuki G et al. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J Cell Physiol* 2005; 205(2): 194–201. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1002/jcp.20376>>.
- Ra JC, Shin IS, Kim SH et al. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. *Stem Cells Dev* 2011; 20(8): 1297–1308. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1089/scd.2010.0466>>.
- Schu S, Nosov M, O'Flynn L et al. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med* 2012; 16(9): 2094–2103. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01509.x>>.
- Phadnis SM, Ghaskadbi SM, Hardikar AA et al. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow of diabetic patients portrait unique markers influenced by the diabetic microenvironment. *Rev Diabet Stud* 2009; 6(4): 260–270. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1900/RDS.2009.6.260>>.
- Javorkova E, Trosan P, Zajicova A et al. Modulation of the early inflammatory microenvironment in the alkali-burned eye by systemically administered interferon-γ-treated mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Dev* 2014; 23(20): 2490–2500. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1089/scd.2013.0568>>.

Mgr. Pavla Boháčová

✉ pavla.bohacova@biomed.cas.cz

Oddělení transplantací imunologie Ústavu experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Praha

www.iem.cas.cz

Doručeno do redakce 30. 11. 2017

Přijato po recenzi 20. 2. 2018