

Bacheloropgave, medicin
Københavns Universitet
Forår 2011

Stamcelletransplantation

- fremtidens diabetesbehandling?

Stud.med. Mette Nygaard Andersen

Vejleder: Professor, Dr. Scient. Jens Høiriis Nielsen

Indholdsfortegnelse

Abstract	3
Resume	3
Indledning	4
Metoder	5
Resultater	5
Diabetes mellitus	5
Type 1	5
Type 2	6
Insulins metaboliske effekter	6
Komplikationer	7
Behandlingsmuligheder til diabetes.....	7
Stamceller	8
Embryonale stamceller	8
Inducerede pluripotente stamceller.....	9
Embryonal udvikling af pancreas	10
Udvikling af beta-celler udfra stamceller	12
NovoCell forsøget.....	12
Diskussion	17
Konklusion	18
Referencer	20

Abstract

Through the last couple of years there has been a number of significant discoveries within stem cell technology and several research projects have named stem cell therapy as a promising future treatment option for diseases that cannot yet be cured with conventional medical or surgical methods. This bachelor's thesis project is a literature study that describes how stem cell therapy can be used for the treatment of diabetes and, based on the research behind stem cell therapy, considers whether stem cell therapy might be a possible future treatment of diabetes. First, the pathogenesis of diabetes and its current treatment is briefly reviewed. Then the creation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells as well as the embryonic development of the pancreas is discussed, as they provide the basis for the protocols developed for the differentiation of stem cells into insulin-producing cells.

Resume

Der er gennem de sidste år gjort en række revolutionerende opdagelser inden for stamcelleteknologien og flere forskningsprojekter har udnævnt stamcelleterapi som en lovende fremtidig behandlingsmulighed for sygdomme, der i dag endnu ikke kan helbredes medicinsk eller kirurgisk. Denne bacheloropgave er et litteraturstudie der beskriver hvordan stamcelleterapi kan benyttes i forbindelse med behandling af diabetes og, med udgangspunkt i de forskningsresultater som ligger til grund for stamcelleterapien, vurderer hvorvidt stamcellebehandling er en mulig fremtidig diabetesbehandling. Først gennemgås kort patogenesis af diabetes og den nuværende behandling. Derefter omtales etableringen af embryonale stamceller og inducerede pluripotente stamceller samt den embryonale udvikling af pancreas, som er grundlaget for de protokoller, der er udviklet til differentiering af stamceller til insulinproducerende celler.

Indledning

Diabetes mellitus er et stort sundhedsmæssigt problem verden over, som i 2010 afficerede mere end 280 millioner mennesker på globalt niveau og dette tal forventes at stige til 438 millioner i 2030 (1). Den markante stigning i antallet af diabetespatienter, vil få store konsekvenser for samfundet idet det pådrages store økonomiske byrder i form af omkostninger til medicinsk behandling samt en reduceret økonomisk produktivitet. Der findes to former for diabetes; type 1 er en autoimmun sygdom, hvor immunforsvaret angriber og ødelægger de insulinproducerende beta-celler i pancreas og type 2, som opstår som resultat af en kombination af nedsat insulinsensitivitet samt forringet funktion af beta-cellerne. Dette medfører hyperglykæmi samt andre metaboliske forstyrrelser. I modsætning til type 1 diabetes der kan opstå allerede i barndommen, rammer type 2 diabetes som regel senere i livet da den forårsages af uhensigtsmæssig livsstil gennem længere tid. Begge former for diabetes kan medføre øget mortalitet ved kardiovaskulære sygdomme, samt mikrovaskulære senkomplikationer, som kan føre til blindhed, nyresvigt og amputation af underekstremiteterne. Diabetes behandles i dag ved hjælp af eksogene injektioner af insulin og kostplaner baseret på at nedsætte kulhydratindtaget, for at kontrollere blodglucose. Denne behandling kræver en god compliance fra patienterne, idet dårligt reguleret blodsukker kan medføre ketoacidose eller hypoglykæmi der begge kan have fatale konsekvenser.

En alternativ behandlingsform til diabetes ville være en kærkommen mulighed for at opnå en forbedring i regulering af blodglucose hos diabetespatienter samt at nedsætte risikoen for hypoglykæmi, ketoacidose og senkomplikationer. En behandlingsform der er blevet forsket i og forsøgt er transplantation af færdigudviklede beta-celler. Dette har vist sig at være en effektiv løsning på selve problemet med insulinmangel, men er dog ikke en helt uproblematisk procedure, idet der stadig vil ske en autoimmun destruktion af beta-cellerne og en vedvarende bibeholdelse af de transplanterede beta-celler vil kræve immunsupprimerende medicin. Desuden findes der ikke ubegrænsede mængder donorvæv (2), og der kan opstå afstødningskomplikationer i forbindelse med transplantationen. En løsning på manglende donorvæv kunne være at udvikle beta-celler fra humane embryonale stamceller (hES celler).

hES celler er pluripotente celler, der har den unikke egenskab at de hver især kan differentiere til en hvilken som helst celle i kroppen - dermed også beta-celler. Ved at danne nye beta-celler som erstatning for de ødelagte, vil man kunne afhjælpe insulinmanglen hos type 1 diabetespatienter. Teoretisk vil denne proces kunne løse problemet med det ødelagte pancreasvæv hos diabetespatienter, men om det også vil kunne fungere i praksis er endnu ikke afklaret.

Metoder

Denne opgaves indhold er baseret på en gennemgang og analyse af tilgængelig litteratur.

Søgningen af denne litteratur er blevet udført bl.a. i PubMed databasen i februar og marts 2011 ved benyttelse af følgende søgestreng: ("Embryonic Stem Cells" [Majr]) AND "Embryonic Stem Cells/transplantation" [MeSH] AND "Diabetes".

Denne søgeprofil gav 28 artikler. Alle tilgængelige abstracts for disse artikler blev læst. Dernæst blev artikler hvis overskrift indeholdt enten "celleterapi", "Diabetes" eller "Embryonale stamceller" udvalgt til gennemlæsning.

Yderligere litteratur blev fundet via de ovenstående artiklers referencer, hvor søgningen i PubMed udførtes ved søgning direkte på artiklens forfattere eller overskrift. Ved søgning via forfattere kom andre artikler op som viste sig essentielle for litteratursøgningen.

Derudover er der blevet søgt litteratur i væsentlige lærebøger samt i REX (KU bibliotekets online katalog).

Ovenstående søgninger resulterede i det relevante materiale, der danner grundlag for denne opgave.

Resultater

Resultatafsnittet indeholder resultaterne af litteraturanalsen. Først gives en kort gennemgang af diabetes mellitus hvor patogenesen samt nuværende behandlingsmetoder beskrives. Dernæst redegøres for stamceller og den embryonale udvikling af pancreas. Til sidst afsluttes afsnittet med en gennemgang af forskningsresultater vedrørende udvikling af beta-celler fra hES samt implantation af disse hos forsøgsdyr for at undersøge funktionen in vivo.

Diabetes mellitus

Diabetes mellitus, i daglig tale kaldet sukkersyge, kendetegnes ved et forhøjet blodglucoseniveau. Diabetes inddeles i to typer, *Type 1* og *Type 2*.

Type 1

Type 1 diabetes (T1D) er en autoimmun sygdom, hvor et samspil mellem genetiske faktorer og miljøforhold udløser en fremadskridende immunologisk proces med destruktion af pancreas' insulinproducerende celler til følge. Dette bevirker en absolut insulinmangel, der fører til hyperglykæmi. Diagnosen stilles ved påvisning af tilstedeværelse af antistoffer mod beta-celler, forhøjet blodglucose samt sænket insulinsekretion. Type 1 opdages som regel i en ung alder, og patienterne vil være afhængige af insulinbehandling resten af livet.

Type 2

Type 2 diabetes (T2D) er ikke en autoimmunsygdom, men skyldes ligesom type 1, et samspil mellem genetiske faktorer og miljøfaktorer. Type 2 er typisk karakteriseret ved en nedsat insulinfølsomhed, oftest i association med overvægt og fysisk inaktivitet. Den nedsatte insulinfølsomhed kan medføre insulinresistens og dermed et øget blodglucose. Behandlingsformen for T2D er diæt samt motion. Derudover suppleres der med insulininjektioner. Type 2 rammer som regel i en senere alder, idet livsstil har en overvejende indflydelse på den nedsatte insulinfølsomhed.

Hovedproblematikken i diabetes er en nedsat insulinproduktion eller en nedsat insulinsensitivitet. Insulin er et hormon, der udskilles fra betacellerne i pancreas og har en central betydning og vigtig funktion i både glucose-, protein- og lipidmetabolismen. Det er yderst vigtigt at kroppens blodglucose holdes stabilt, idet både et forhøjet samt sænket blodglucose kan være skadeligt for organismen. Uanset aktivitetsniveau og kostindtagelse skal blodglucose holdes stabilt inden for det samme snævre interval, [4;7] mmol/l (3). Insulin spiller en vigtig rolle i reguleringen af blodglucose idet det fremmer optagelsen, nedbrydningen og lagringen af glucose i de forskellige væv.

Insulins metaboliske effekter

Pancreas udskiller insulin som respons på indtagelse af et kulhydratrigt måltid. Hovedparten af den glucose der optages efter et måltid lagres i muskel- og leverceller som glykogen samt i fedtvævsceller som fedt. Glykogen og fedt kan senere omsættes til energi. Transporten af glucose ind i cellerne, over cellemembranen, varetages af en række specifikke glucosetransportørproteiner som reguleres af insulin. Udover at fremme glykogen- og fedtopbygningen fungerer insulin også som en hæmmer for de processer hvor der sker en nedbrydning af glykogen i musklerne samt de processer hvor der sker en nedbrydning af fedtvæv med frigørelse af frie fede syrer (FFA) som resultat.

Mange af kroppens celler, især hjernens neuroner, er afhængige af en kontinuerlig tilførsel af glucose fra blodet. Ved faste eller nedsat indtagelse af kulhydrater, vil insulinsekretionen hæmmes, idet der ikke er brug for at lagre glucose, men derimod for at frigive glucose. Denne opgave varetages af leveren ved at der dannes glucose ud fra aminosyrer, laktat og glycerol (gluconeogenese). Ved indtagelse af kulhydrater, vil insulin blive frigivet og netop hæmme gluconeogenesen. Den samlede effekt af insulin på glucosemetabolismen i leveren er således en nedsat glucosesyntese samt en øget deponering af glucose i form af glykogen.

Insulin øger lipidsyntesen i lever- og fedtvæv, hvilket, i kombination med en hæmning af fedt nedbrydning, fører til akkumulation af fedt i fedtvæv. I en fastesituation vil der være en nedsat insulinsekretion, ligesom den man vil se hos diabetespatienter. Dermed vil insulin ikke have inhiberende effekt på fedtsyreudskillelse, hvilket vil medføre et øget fedtsyretilbud til leveren, som leder til en øget oxidation af fedtsyrer og at acetyl-CoA ophobes. Som resultat af dette dannes der

en øget mængde ketonstoffer med risiko for udvikling af ketoacidose til følge. Denne komplikation er ikke ualmindelig hos diabetespatienter og kan være potentielt dødelig.

Komplikationer

Udover faren for en alvorlig ketoacidose er et liv med diabetes også forbundet med risiko for udvikling af sendiabetiske komplikationer i form af skader på nyrer, øjne, det perifere nervesystem og de store kar. Disse senkomplikationer kan medføre blindhed, nefropati, neuropati, amputation af underekstremiteterne samt kardiovaskulære sygdomme. Det er af afgørende betydning for reduktion af senkomplikationer, at der tilstræbes et stabilt, normalt blodglucoseniveau (4). Dette kontrolleres ved eksogene injektioner af insulin subkutant. Injektionerne er tilpasset den enkelte patient, idet insulinbehovet er individuelt og varierer efter alder, kostsammensætning og andre faktorer. Denne behandlingsform stiller krav til patienten og det er derfor vigtigt at patienten passer sine insulininjektioner og er opmærksom på blodsukkeret samt indtagelsen af kulhydrater. Involvering af familie samt uddannelse af denne i diabetesbehandling er nødvendig for at sikre at patientens tilstand forbliver effektivt behandlet. God compliance og sygdomsforståelse fra patientens side er også vigtig; for få insulininjektioner kan pådrage patienten senkomplikationer og i værste tilfælde ketoacidose, for mange injektioner kan medføre hypoglykæmi. En alternativ behandlingsform der ikke kræver så meget opmærksomhed og præcision fra patienten, vil være et godt alternativ for at opnå en bedre regulering af blodglucose hos patienten og dermed undgå udvikling af sendiabetiske komplikationer, ketoacidose samt hypoglykæmi.

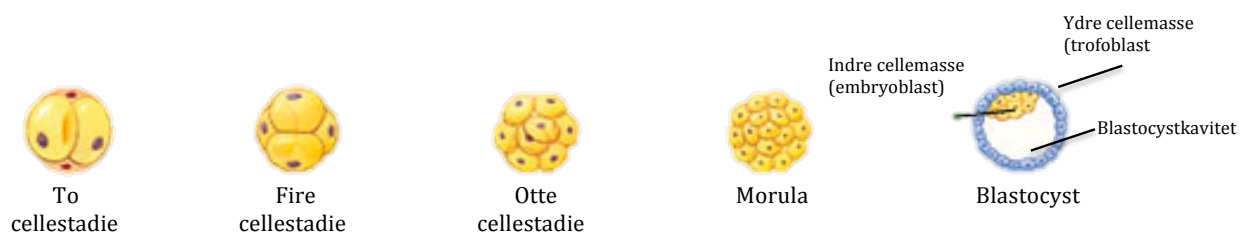
Behandlingsmuligheder til diabetes

Det har længe været et forskningsmål at finde nye og bedre behandlingsmuligheder til diabetespatienter. Et af de første gennembrud skete for omkring 40 år siden, hvor den første transplantation af pancreas fandt sted (5). Transplantationer blev udført og viste sig at have en positiv virkning hos type 1 diabetespatienter (5). Dog viser det sig at indoperationen af pancreas er både en kompliceret og ikke helt ufarlig operation og at den derfor ikke bør vælges som første alternativ (5). Fem år senere blev de første eksperimenter med transplantation af isolerede Langerhanske øer foretaget. Dette viste sig at være langt mindre risikabelt end transplantation af hele pancreas (5), men var til gengæld stadig på bekostning af livslang immunsuppression hos patienterne (6). Derfor foretog man forsøg hvor man indkapslede de transplanterede beta-celler for at undgå immunforsvarets angreb af disse (7). Det er dog begrænset med tilgængelighed til donormateriale, hvilket problematiserer denne behandlingsform (8). For at imødekomme manglen på donormateriale har forskere foreslået at benytte de mængdemæssigt ubegrænsede stamceller som en lovende alternativ behandlingsform til diabetes (9, 10).

Stamceller

Stamceller er de celler der giver ophav til alle celler i kroppen. Stamceller har tre karakteristiske egenskaber, de er uspecialiserede, de kan differentiere til nye celler og de har evnen til at proliferere.

Zygoten, et befrugtet æg, deler sig først til to celler, som hver igen deler sig til to og fortsætter indtil det har nået 16-cellestadiet, morula. Ved 16-cellestadiet er cellerne allerede begyndt at vise tegn på differentiering. Ved fortsat celledeling bliver morula til en blastocyst, som danner to lag; et ydre og et indre celleglag. Den indre cellemasse består af pluripotente stamceller, som kan differentiere til alle de celler der dannes ud fra de tre kimlag, *se figur 1*.



Figur 1

Figur er modificeret fra http://www.mhhe.com/biosci/esp/2002_general/Esp/folder_structure/re/m2/s2/assets/images/rem2s2_1.jpg
Figuren viser hvordan tocellestadiet udvikles til firecellestadiet og dernæst morula, som til sidst ender som blastocysten.

Ved implantation af blastocysten i uterus sker der yderligere celledelinger, hvor de pluripotente stamceller påbegynder deres specialisering. Disse pluripotente stamceller kaldes embryonale stamceller (ES celler). Efter 4 - 8 uger er specialiseringen sket (10) og ved yderligere deling bliver de pluripotente stamceller til de mere specialiserede multipotente stamceller, hvilket vil sige, at de kun er i stand til at danne et begrænset antal celletyper. Visse multipotente stamceller har den egenskab at de kan blive aktive i celleproliferation og dermed danne nye celler i specifikt væv, for eksempel som respons på beskadigelse af væv.

Embryonale stamceller

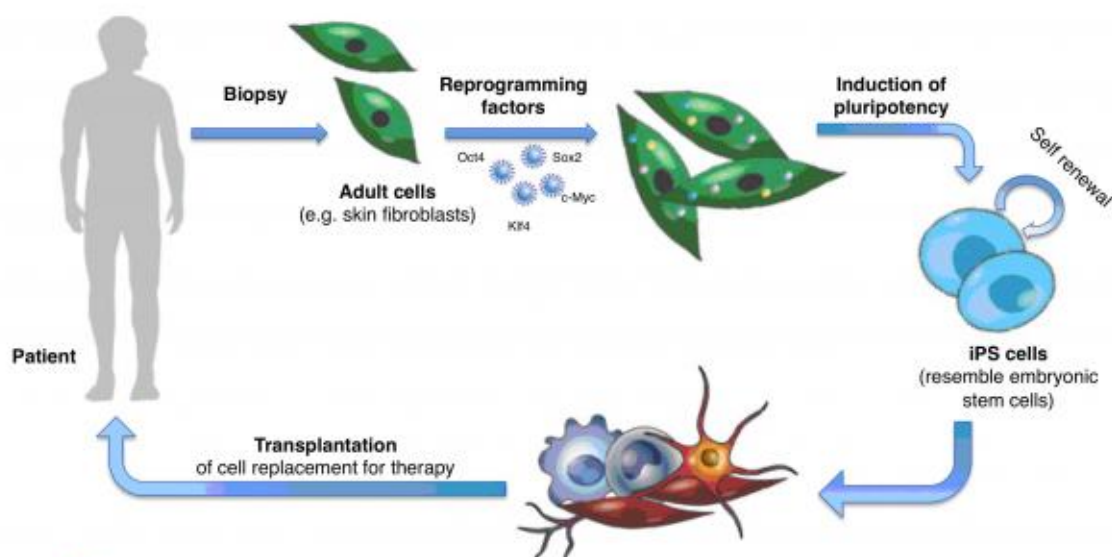
Ved at fjerne de embryologiske stamceller (den indre cellemasse) fra blastocysten fra dyr eller mennesker, kan disse vokse in vitro i laboratorier og udvikles til forskellige cellelinjer (11).

Differentiering af ES celler til forskellige cellelinjer er ikke en spontan proces, hvilket vil sige at cellerne skal anspores til celledeling inden for den cellelinje man ønsker at frembringe. Dette er ikke en simpel opgave, idet det kræver en bestemt kombination af mineraler, signaleringsmolekyler, transkriptionsfaktorer med mere (12). Når metoden til at dyrke en bestemt cellelinje er fastlagt, kan specialiserede celler dannes in vitro og derpå transplanteres in vivo og erstatte ødelagt væv. Dette

lyder umiddelbart som en oplagt og forholdsvis bekvem løsning på mange sygdomme, men i forbindelse med transplantation af ES celler opstår en række problemer. For det første vil der altid blive rejst etiske spørgsmål i forbindelse med stamceller. Idet stamceller udtages fra fostre, vil disse blive destrueret i processen, som nogle vil sidestille med at tage et liv (12). For det andet vil det kræve at man svækker immunsystemet for at undgå afstødning. Disse to problemstillinger kan dog løses ved at benytte multipotente stamceller udtaget fra den patient man påtænker at behandle med en transplantation.

Inducerede pluripotente stamceller

Nyere forskning viser at det er muligt ved hjælp af en ændring i genekspressionen, at tillade en specifik celletype at differentiere til en anden celletype. Dette kan benyttes til, at man ud fra færdigdifferentierede stamceller kan danne inducerede pluripotente stamceller (iPS celler) (13). Denne proces kaldes *nuclear reprogramming*. Ved hjælp af fire transkriptionsfaktorer, Oct4, Klf4, Sox2 og c-Myc har man fundet frem til hvordan det er muligt at omprogrammere multipotente somatiske celler til pluripotente stamceller, se figur 2 (11).



Figur 2

Figur er taget fra http://www.eurostemcell.org/files/images/iPS_diagram_0.img_assist_custom-600x450.jpg

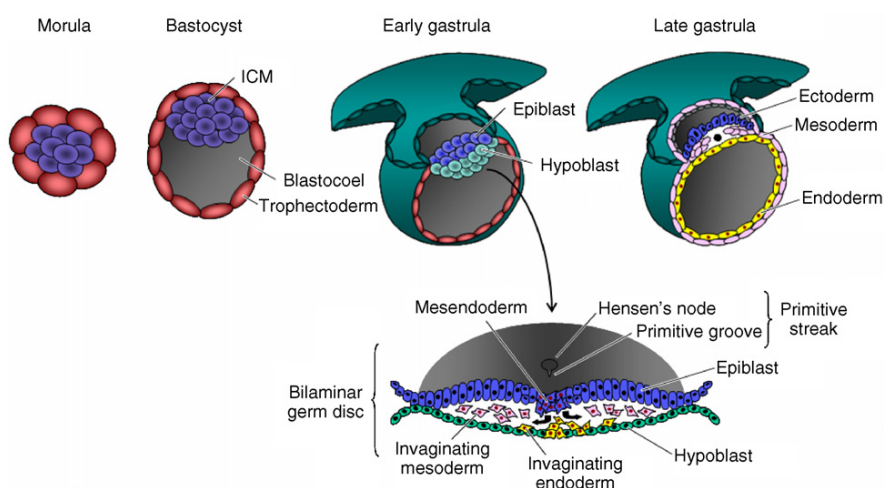
Figuren viser hvordan celler, udtaget fra en biopsi kan omprogrammeres ved hjælp af de fire transkriptionsfaktorer, Oct4, Sox2, Klf4 og c-Myc. Derefter kan cellerne in vitro danne nye cellelinjer og på den måde udvikle sig til en helt anden celle end det den var som udgangspunkt ved biopsien, og herefter tilbagetransplanteres til samme patient som cellerne blev udtaget fra.

iPS celler løser en del af de problemer der er ved at benytte ES celler. Idet de kan tages fra ethvert individ vil de være patientspecifikke og dermed kompatible med patientens eget immunsystem (11).

Da patientspecifikke iPS celler løser problemet med begrænset adgang til tilstrækkelige mængder donorvæv, eliminerer behovet for immunsuppression samt overflødiggør den etiske betænkning, er en række af de væsentligste barrierer på vejen til en stamcellebaseret behandling af diabetes nedbrudt.

Embryonal udvikling af pancreas

Pancreas er et specialiseret kirtelorgan, der består af både en eksokrin og en endokrin del. Den eksokrine del af pancreas består af acinære celler der udskiller forskellige typer af fordøjelsesenzymer, og derved deltager i fordøjelsesprocessen. De endokrine celler er arrangeret i Langerhanske øer, og inddeles i fire forskellige typer; α -celler som udskiller glukagon, β -celler der udskiller insulin, δ -celler som udskiller somatostatin og til sidst PP-cellerne som udskiller pancreatisk polypeptid.



Figur 3

Figur er taget fra (14).

Figuren viser hvordan morula bliver til blastocysten som danner den indre cellemasse (ICM) og den ydre cellemasse. ICM udvikles videre til den bilaminære kimskeive, der består af et epiblastlag og et hypoblastlag. Ved gastrulation giver epiblasten ophav til endoderm, mesoderm og ectoderm.

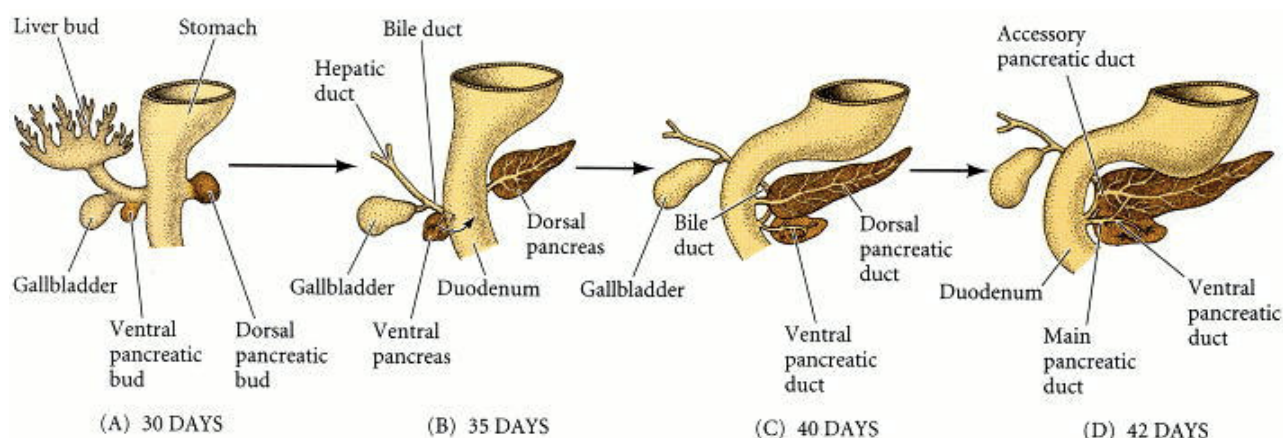
Den embryonale udvikling starter ved fertilisation af ægget, hvor blastocysten dannes. Blastocysten, der består af 50-60 celler (14), udgøres af den ydre cellemasse, kaldet trofoblasten og den indre cellemasse kaldet embryoblasten. Trofoblasten danner placenta og blommesækken, mens embryoblasten giver ophav til selve embryoet, ved at danne den bilaminære kimskeive.

Embryoblasten differentierer i to lag: hypoblastlaget, som er et lag af små kubiske celler der vender mod blastocystkaviteten og et epiblastlag, der danner et højt cylinderepithel mod amnionhulen.

Cirka tre uger efter fertilisationen, undergår blastocysten gastrulation, hvorved de tre kimlag: ectoderm, mesoderm og endoderm dannes, *se figur 3*.

Pancreas udvikles fra endodermale celler til et dorsalt- og ventralt pancreasanlæg, som vokser frem fra duodenum's endodermalbeklædning (15). Ved duodenum's rotation mod højre, rykker den ventrale pancreasknop dorsalt og vokser sammen med den dorsale pancreasknop, *se figur 4*.

I udviklingen af pancreas indgår forskellige transkriptionsfaktorer og signalmolekyler, som sørger for den specifikke udvikling af organet i de forskellige udviklingsstadier. Homeobox genet Pdx1, der betragtes som det vigtigste signalmolekyle, udtrykkes i mere eller mindre grad i alle cellerne i pancreas under dens udvikling, men er kun at finde i beta-cellerne i den færdigudviklet pancreas (16). Et andet homeobox gen Hlxb9 udtrykkes også i pancreas, men dominerer langt tidligere i udviklingsstadiet end Pdx1 (17). Pdx1 spiller en vigtig rolle i både dannelsen og væksten af pancreasanlæggenes, hvorimod Hlxb9 primært står for dannelsen af de to pancreasanlæg. Pdx1 er vigtig for både den dorsale- og ventrale knop, hvor Hlxb9 udelukkende har en effekt i den dorsale (18).



Figur 4

Figur er taget fra <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10107/>
Pancreas' udvikling.

A: Viser hvordan der ud fra duodenum's endodermalbeklædning vokser et dorsalt og ventralt pancreasanlæg. B: Rotation af duodenum. C: Efter rotation af duodenum er det ventrale pancreasanlæg flyttet dorsalt om til det dorsale pancreasanlæg. D: De to pancreasanlæg vokser sammen og danner den færdigudviklede pancreas, der indeholder både endokrine og eksokrine celler.

De signaler der bestemmer den konkrete lokalisering af pancreasudvæksten kendes ikke (19). Signalmolekylet Sonic hedgehog (Shh) udtrykkes i tarmendodermen, hvorfra pancreas udvikles, men i selve pancreasanlæggenes sker der ikke en ekspression af Shh (19). Repression af Shh medfører en ekspression af Pdx1 og andre pancreasgener (20). Denne repression af Shh er forskellig fra den dorsale- og ventrale pancreasknop. Den dorsale pancreasknop er i direkte kontakt med notochorden, som udskiller notochord faktorerne FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) og activin- β B,

der hæmmer ekspresionen af Shh (21). Idet den ventrale pancreasknop ikke er i kontakt med notochorden, sker repressionen af Shh af andre mekanismer (22). Den ventrale del udvikles til to anlæg. Et af disse anlæg videreudvikles til leveren, da den står i direkte kontakt med den kardiale mesoderm som producerer FGF2 (16). Den del af det ventrale anlæg som ikke er i kontakt med den kardiale mesoderm udvikles til pancreas (16).

Den videre udvikling af pancreas sker ved differentiering til endokrine og eksokrine celler, som afhænger af follistatin og neurogenin 3 (Ngn3) genet. Differentiering til eksokrine celler sker ved høje niveauer af follistatin (18), mens differentiering til endokrine celler sker ved høje niveauer af Ngn3 (23).

Denne detaljerede viden om pancreas' udvikling giver nøjagtig information om hvordan hES celler in vitro kan udvikles til funktionelle beta-celler.

Udvikling af beta-celler udfra stamceller

Kendskabet til pancreas' embryonale udviklingsproces bliver brugt til videre forskning i den praktiske fremstilling af endodermderiverede beta-celler. Man er kommet frem til at en kombination af activin A og retinolsyre tilsat et serum-frit medium med hES celler, medfører udvikling af insulinproducerende celler (24). Mus der er behandlet med streptozotocin (STZ)¹ for at inducere hyperglykæmi ved at ødelægge deres egne beta-celler, har fået transplanteret de endodermderiverede beta-celler, hvorefter det har vist sig at blodsukkeret hos alle disse mus falder sammenlignet med musene i kontrolgruppen (24). Dette forsøg viser at det er muligt at udvikle beta-celler udfra hES celler, hvilket NovoCell bekræfter i deres protokol fra februar 2008 (25).

NovoCell forsøget

NovoCell udviklede endokrine pancreasceller ud fra den strategi at efterligne pancreas' biologiske udvikling så meget så muligt. Dette var en opgave der viste sig at generere store udfordringer, idet celler in vitro ikke opfører sig nøjagtig ligesom celler i det udviklende foster (25). NovoCell udviklede en 5-trins protokol for differentieringen af hES celler til pancreatiske endokrine beta-celler, se figur 5.

Trin 1

Cellerne gennemgik et skift fra mesendoderm til definitiv endoderm (DE), ved tilsætning af højt koncentreret activin A (100 ng/ml). Activinbehandlingen tog tre dage, hvor Wnt3a kun tilføjedes på førstedagen. Derefter udtrykte cellerne DE

¹ STZ transporteres ind i beta-cellerne via GLUT2, som har en relativ lav ekspresion hos humane beta-celler, hvilket beskytter disse mod den cytotoxiske dosis der ødelægger muse beta-celler.

markørerne CER og CXCR4. Denne overgang til DE var en nødvendighed for den videre udvikling til beta-celler.

Trin 2

Activin A blev fjernet fra mediet, hvilket initierede at DE udvikledes til den primitive tarm. Dette blev indikeret ved at DE markørerne CER og CXCR4 faldt, hvorimod den primitive tarms markører HNF1B og HNF4A steg. Udover at activin A blev fjernet, tilsattes FGF10 og hedgehog-signalerings hæmmeren KAAD-cyclopamine, som havde yderligere indflydelse på resten af processen.

Trin 3

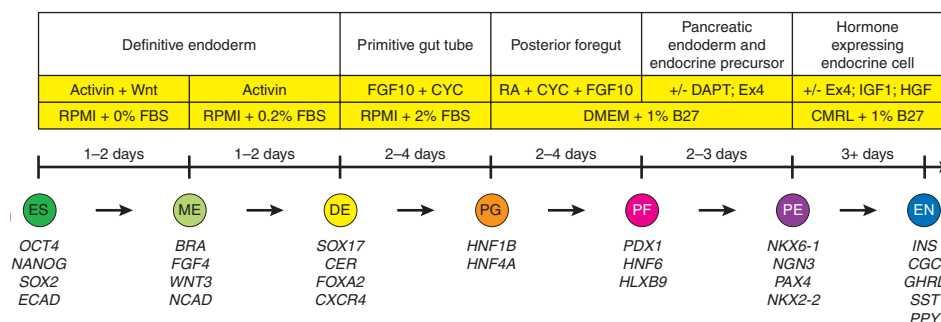
Mediet blev herefter eksponeret for retinolsyre sammen med FGF10 og KAAD-cyclopamine. Ved tilsætning af denne kombination til mediet blev høje niveauer af Pdx1 udtrykt, mens den primitive tarms markører fortsat blev udtrykt.

Trin 4

Idet der nu sås en ekspression af Pdx1 i mediet, viste det tegn på at pancreatisk epitel var blevet udviklet. Udover Pdx1, blev der også udtrykt Ngn3 som er et tegn på differentiering af det pancreatiske epitel til endokrine celler.

Trin 5

Efter 15 dage, observeredes endokrine celler, der udskilte henholdsvis insulin, glukagon, somatostatin og pancreatiske polypeptid.



Figur 5

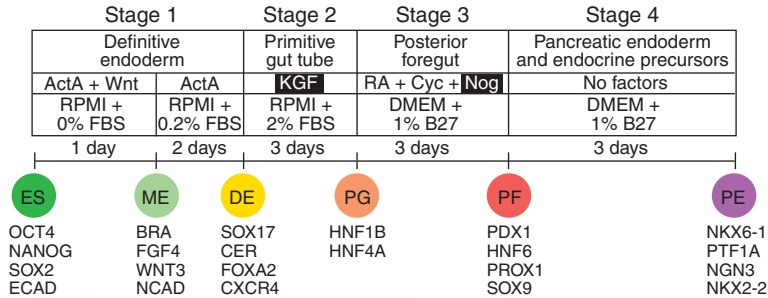
Figur er taget fra (25).

Skematisk differentieringsprocedure af pancreatisk væv.

Dette skema viser de fem stadier hvori differentieringen skete, samt hvilke vækstfaktorer, medier og tidsrammer der blev anvendt for hvert stadie.

Forklaring af forkortelser på figuren: RA, retinsyre; DAPT, γ -secretase inhibitor; Ex4, exendin-4; IGF1, Insulin-like Growth Factor 1; HGF, Hepatocyt Growth Factor; **ES**, hES celle; **ME**, mesendoderm; **DE**, definitiv endoderm; **PG**, primitiv tarm; **PF**, posterior fortarm; **PE**, pancreatisk endoderm; **EN**, hormon-udtrykkende endokrine celler.

De uddifferentierede hES celler blev opbevaret på et lag af fibroblaster fra musefostre tilsat forskellige faktorer (25). Selve differentieringen blev udført i tre forskellige cellemedier; RPMI (Mediatech), DMEM (HyClone) eller CMRL (Invitrogen). Disse cellemedier blev suppleret med glutamax, penicillin/streptomycin samt varierende koncentrationer af FBS (Fetal bovine serum) eller 1% B27 supplement, *se figur 5* (25). Differentieringsprocessen beskrevet i NovoCell-forsøget blev udført med CyT203 hES cellelinjen.



Figur 6
Figur er taget fra (26).
Skemaet viser ændringerne i differentieringsprocessen, som er markeret under stadie 2 og 3.

For at undersøge om den in vitro producerede pancreatiske endoderm kunne danne fungerende endokrine celler in vivo, blev cellekulturen med stadie-4 cellerne implanteret på immunkompromitterede mus (26). Der var i det videre forsøg ændret i udviklingsprocessen af de endodermderiverede endokrine celler og resulterede i CyT49 cellelinjen, *se figur 6* (26). Aggregater bestående af $\sim 0,5-1 \times 10^7$ celler blev anbragt på en gelsvamp, og derefter overlejret med Matrigel. Denne sammensætning blev implanteret til hver af de to epididymis' fedtpuder på 105 svært immundefekte hanmus (26). 30-60 dage efter implantationen blev glucosestimuleret insulinsekretion vurderet på baggrund af analyser af C-peptidniveauet i serum fra mus efter en glucoseindgift. Niveautet lå meget lavt 30 dage post implantation. De efterfølgende to måneder steg både faste- og glucose-stimuleret C-peptid hos de fleste mus, *se tabel 2*. Efter længere tids implantation (> 150 dage) steg det glucosestimulerede C-peptidniveau som tegn på øget insulinsekretion, mens fasteniveauet blev stabiliseret (26). *Dette viste at de implanterede endodermderiverede beta-celler udskilte insulin, som var reguleret efter både faste-induceret hypoglykæmi og glucoseindgift.*

Tabel 1 Niveautet af C-peptid i serum ved faste og glucoseindgift hos forsøgsgruppe og kontrolgruppe

	Forsøgsgruppe	Kontrolgruppe
Faste	660 ± 280 pM	330 ± 130 pM
Glucoseindgift	2180 ± 1120 pM	3430 ± 1300 pM

Tal er taget fra (26)

Tre måneder post implantation var niveauet af C-peptid i faste og ved glucoseindgift tilnærmelsesvis det samme som hos kontrolgruppen², *se tabel 1*. Desuden viste de to grupper sig at udskille insulin efter samme kinetik ved samme glucoseindgift. Derudover afhang C-peptidniveauet af den mængde glucose der blev indgivet (26). *Dette bekræftede yderligere at de implanterede endodermderiverede beta-celler var glucosefølsomme.*

Tabel 2 Glucose-stimuleret sekretion af human C-peptid og insulin

	Mouse no.	Days post implant	Serum C-peptide (pM)			Serum insulin (pM)		
			Fasting	30' glucose stimulated	60' glucose stimulated	Fasting	30' glucose stimulated	60' glucose stimulated
Nonimplanted	<i>n</i> = 4	na	0	0	0	1	6	2
Adult islets	i1	d246	422	2,418	4,338	71	267	280
	i2	d365	235	1,148	2,513	100	369	309
hES cell-derived pancreatic endoderm	36	d30	7	nd	19	nd	nd	nd
		d44	94	227	202	nd	nd	nd
		d71	482	777	1,153	nd	nd	nd
		d94	611	1,949	2,625	187	589	384
	39	d30	26	nd	43	nd	nd	nd
		d44	152	200	463	nd	nd	nd
		d71	333	1,209	2,930	nd	nd	nd
		d94	590	2,154	1,632	173	665	293
	40	d30	35	nd	75	nd	nd	nd
		d44	113	865	1,696	nd	nd	nd
		d71	512	1,836	2,366	nd	nd	nd
		d94	656	2,257	2,775	nd	nd	nd
	41	d30	37	nd	87	nd	nd	nd
		d44	159	584	1,248	nd	nd	nd
		d71	578	1,477	2,588	nd	nd	nd
		d94	701	1,210	1,773	146	366	402
	42	d30	33	nd	103	nd	nd	nd
		d44	215	693	1,327	nd	nd	nd
		d71	566	1,522	2,753	nd	nd	nd
		d94	468	1,423	1,556	82	390	333
	44	d30	18	nd	51	nd	nd	nd
		d44	226	992	548	nd	nd	nd
		d71	835	1,936	2,896	nd	nd	nd
		d94	722	2,007	3,856	217	336	757

na, not applicable; nd, not determined.

Tabel er taget fra (26)

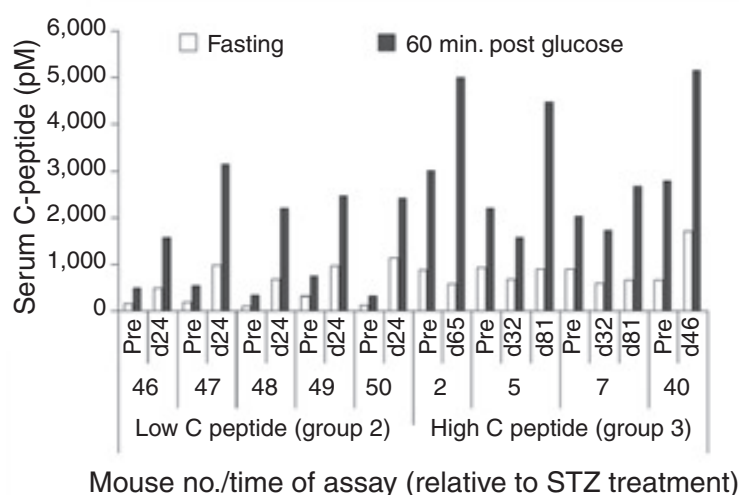
For yderligere undersøgelse af hvorvidt cellerne medvirkede til regulering af blodglucose, blev der målt serum niveauer af C-peptid og glucose clearance hos mus med forskellige implantationstidspunkter. Tallene viste at jo længere tid der var gået efter implantationen desto større var glucose clearance, hvilket indikerer et fald i blodglucose. Samtidig med et faldende blodglucose steg serumniveauet af C-peptid, *se tabel 2*. Desuden faldt faste blodglucose (fra 126 ± 23 mg/dl ved 30 dage post implantation til 88 ± 8 mg/dl ved 75 dage post implantation, 75 ± 6 mg/dl ved 144 dage post implantation og 47 ± 2 mg/dl ved 185 dage post implantation)^β (26). *Disse*

² Kontrolgruppen består af mus, der har fået implanteret 3000-5000 pancreatiske øer.

tal indikerede at de stamcellederivede beta-celler udførte en reguleret insulinsekretion som respons på glucoseindgift.

Immunhistokemisk karakterisering af cellerne i et immunfluorescerende mikroskopi med humane nukleare antigener blev foretaget for at fastlægge om de insulinproducerende celler stammede fra de inducerede hES cellederivede beta-celler. Idet cellerne blandt andet udtrykte Pdx1, andre vigtige pancreatiske hormoner samt transkriptionsfaktorer kunne det konkluderes at de insulinproducerende celler var endodermderivede (26).

Derudover blev der udført histopatologiske undersøgelser af det hES cellederivede pancreasvæv. Idet stamceller har evnen til proliferation er der risiko for at de ved transplantation kan føre til dannelse af teratomer, som er en blandingssvulst af celler fra mere end et kimlag. 46 ud af de 105 mus blev analyseret og man fandt at 1 ud af de 46 (2,2 %) havde et umodent teratom. Seks andre viste tegn på teratomdannelse der mindede om en monodermal form for teratom. Samtidig kunne det fastslås at 36 ud af 46 implantater viste en endokrin cellemorfologi på > 70% (26).



Figur 7

Figur er taget fra (26).

Human C-peptid målinger hos mus en uge før STZ behandling og et indikerede antal dage efter STZ behandling.

En sidste undersøgelse af de transplanterede hES celler blev udført for at kunne fastslå om cellerne kunne regulere blodglucose uafhængigt af de endogene pancreatiske øer. Musene blev behandlet med STZ, som destruerer de endogene pancreasceller og kun efterlader funktionelle humane beta-celler, det vil sige de transplanterede hES cellederivede. Efter STZ behandling af musene blev glucosestimuleret insulinsekretion igen testet, og det viste at de implanterede hES cellederivede beta-celler bevarede deres funktion, *se figur 7* (26). Disse data indikerede at de in vivo udviklede hES cellederivede endokrine celler forblev upåvirkede af STZ.

Cirka 100 dage efter STZ behandlingen blev implantaterne fjernet og blodglucose i musene steg efterfølgende til hyperglykæmisk niveau (26). *Dette bekræftede yderligere at de hES cellederiverede endokrine celler modvirkede STZ-induceret diabetes.*

Diskussion

Interessen i at udvikle en stamcellebaseret terapi for diabetes er stor blandt forskere og behandlere. Hvis en sådan celleterapi skal være relevant for behandling af diabetes, kræves det at der er en rigelig forsyning af celler, ingen afstødningssproblematik samt at cellerne skal være glucosefølsomme og dermed udskille en reguleret insulinmængde. Det vil sige at de transplanterede celler skal respondere på kroppens fysiologiske behov på samme måde som en normal og velfungerende pancreas (27).

NovoCells resultater viser at det er muligt at udvikle endokrine beta-celler ud fra hES celler og transplantere disse til mus. Desuden viser det også at beta-cellerne responderer på glucose og dermed funktionelt identiske med voksne humane pancreatiske øer (26). NovoCell konkluderer at hES celler kan være en vedvarende ressource til erstatning af ødelagt pancreasvæv i stamcelleterapi ved diabetes (26).

En anden forskergruppe udførte i juni 2010 et lignende forsøg efter NovoCells protokol, men udviklede, i modsætning til NovoCell, kun en lille mængde insulinproducerende pancreatiske endokrine celler (28). Disse blev planteret hos forsøgsdyr, og først 20 uger post implantation blev de endokrine celler udviklet, og da kun i 50% af implantaterne (28). Desuden var mængden af insulinsekretion fra beta-cellerne så lille, at det ikke havde nogen klinisk relevans (28).

Der kan være en række årsager til de afvigende forsøgsresultater. NovoCell angiver i deres protokol at de benytter CyT49 cellelinjen hvorimod det i det efterfølgende forsøg bliver angivet at man bruger en anden ikke nærmere specificeret cellelinje. Dette kan meget vel være en grund til at de to forsøg får så forskellige udfald. Derudover blev NovoCell-forsøget udført på mus, mens det lignende forsøg blev udført på athymiske rotter, som viste sig at være relativt mere insulinfølsomme sammenlignet med en anden type rotte, hvilket kan være en bias i forsøget da dens metaboliske miljø muligvis ikke er ideel for udvikling af endokrine beta-celler (28).

Selv hvis NovoCells protokol virker, er der stadig nogle forhindringer, der skal overvindes med hensyn til udviklingen og transplantationen af hES celler. Sikkerheden ved transplantationen skal være i orden, så man undgår dannelse af teratomer og andre tumorer. Desuden er problemet med immunforsvarets destruktion af beta-cellerne i diabetespatienter stadig ikke løst. Disse to

problemstillinger forskes der i at løse ved indkapsling af beta-cellerne. Således pareres immunforsvarets angreb af cellerne og tumordannelse hindres idet indkapslingen umuliggør uønsket cellevandring (7).

Indtil videre er der endnu kun forsket i transplantation af stamceller til mus og rotter. De forskelle der eksisterer mellem mennesker og gnavere kan bevirke at stamcellerne agerer på en anden måde i menneskekroppen end de gør hos gnavere. Det er også et forskningsområde som ikke er blevet undersøgt tilbundsgående nok til drage nogen konklusioner på.

Udover stamcelleterapi forskes i andre alternative behandlingsstrategier til diabetes mellitus. I en artikel fra 2005 nævnes genterapi som en mulig løsning på den autoimmune destruktion af beta-cellerne, som dermed kunne fungere som et supplement til stamcelleterapien. Immunmodulerende genterapi kan inddeles i forebyggende, supplerende og helbredende strategier. Disse strategier sigter på at tilskynde tolerance over for transplanterede beta-celleantigener, ved enten at øge tolerance inducerende T-lymfocytter, undertrykke reaktive T-lymfocytter eller ved at inducere tolerance hos målcellerne ved at undertrykke cytokin-signalering (29). En anden mulighed er en glucosesensitiv computerstyret insulinpumpe, der responderer på organismens målte blodglucose og derpå administrerer en passende mængde insulin automatisk. Denne behandlingsform vil uden at kræve engagement kunne optimere diabetesbehandlingen for patienter som har svært ved at levere den nødvendige compliance (30).

Konklusion

Der findes mange grunde til at ønske sig en bedre behandling af diabetes. I særdeleshed den, for patienten, krævende behandlingsproces med daglige blodglucosemålinger og efterfølgende insulininjektioner samt de alvorlige og til tider livstruende komplikationer der kan opstå hvis behandlingen ikke følges. Kombineret med det faktum at antallet af diabetespatienter forventes at stige med 56% over de kommende 20 år (1), efterstræbes en mere effektiv behandling af diabetes. En sådan behandlingsform kunne være at erstatte de ødelagte beta-celler, hvilket gør stamcelleterapi til en oplagt mulighed. Ved denne behandlingsform findes der dog nogle forhindringer, såsom afstødning af implantater, tumordannelse samt immunforsvarets vedvarende bekæmpelse af implanterede beta-celler. Opdagelsen af iPS celler, som kan fremstilles i samme, stort set ubegrænsede mængder som hES celler, fra patientens egne somatiske celler, kan være en løsning på problematikkerne med afstødning, begrænset tilgang til donormateriale og de etiske spørgsmål. Forskning i pancreas' embryonale udvikling har tilført en udførlig forståelse som kan bruges til

udvikling af beta-celler fra hES celler. NovoCell-forsøget viste, at beta-celler fremdyrket fra hES celler kan transplanteres in vivo og fungere som glucosefølsomme insulinsecernerende celler. Det uafhængige forsøg udført for at efterprøve NovoCells protokol, efterviste resultaterne med det forbehold at de implanterede beta-celler udskilte klinisk insufficiante insulinmængder. Forskellen i resultaterne bærer vidne om at der er tale om avanceret forskning som endnu er i sine allertidligste stadier.

På trods af de gode resultater fra NovoCell-forsøget, er det vigtigt at påpege at det endnu ikke er bevist om metoden vil være forenelig med menneskeorganismen, idet transplantationen hidtil kun er blevet afprøvet på gnavere.

Sikkerhedsproblematikken er endnu ikke løst og den er et vigtigt forhold at få på plads inden transplantation afprøves på mennesker. Forskere foreslår at indkapsling af de transplanterede beta-celler kan forebygge tumordannelse. Yderligere påpeges det at samme indkapslingsmetode sandsynligvis vil kunne hindre immunforsvarets angreb på beta-cellerne – et problem som måske i fremtiden også vil kunne løses ved hjælp af genterapi.

De problemstillinger som er beskrevet i denne opgave, er endnu ikke tilstrækkelig udforsket til at en endelig behandlingsmetode foreligger. Det må dog ud fra ovenstående overvejelser slutes at en stamcellebaseret terapi realistisk set, en dag i fremtiden, vil kunne være en del af en effektiv diabetesbehandling.

Referencer

- (1) Nina Engberg MHODM. Fra stamceller til funktionelle betaceller ved type 1-diabetes. Ugeskrift for Læger. 2010;172:2608-12.
- (2) Madsen OD, Serup P. Towards cell therapy for diabetes. Nat Biotechnol. 2006;24:1481-3.
- (3) Oluf Borbye Pedersen HB-N, Allan Flyvbjerg, Thomas Mandrup Poulsen. Medicinsk Kompendium. Bind 2. 17 ed. København: Nyt Nordisk Forlag Arnold Busck; 2009. p. 2350.
- (4) Torsten Lauritzen BH, Jens Sandhal Christiansen. Diabetes. 1 ed. København: Munksgaard Danmark; 2007. p. 118-9.
- (5) Ludwig B, Ludwig S, Steffen A, Saeger HD, Bornstein SR. Islet versus pancreas transplantation in type 1 diabetes: competitive or complementary? Curr Diab Rep. 2010;10:506-11.
- (6) Claiborn KC, Stoffers DA. Toward a cell-based cure for diabetes: advances in production and transplant of beta cells. Mt Sinai J Med. 2008;75:362-71.
- (7) Wong AL, Nierras CR. Do stem cell-derived islets represent a commercially viable treatment for Type 1 and 2 diabetes? Regen Med. 2010;5:839-42.
- (8) Spence JR, Wells JM. Translational embryology: using embryonic principles to generate pancreatic endocrine cells from embryonic stem cells. Dev Dyn. 2007;236:3218-27.
- (9) Wainwright SP, Williams C, Michael M, Farsides B, Cribb A. From bench to bedside? Biomedical scientists' expectations of stem cell science as a future therapy for diabetes. Soc Sci Med. 2006;63:2052-64.
- (10) Brignier AC, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. J Allergy Clin Immunol. 2010;125:S336-44.
- (11) Gary S. Stein MBMXL, Meng-Jiao Shi, Kelly P. Smith, Priscilla Vazquez. Human Stem Cell Technology and Biology. 1. ed. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2011.
- (12) Allman T. Diabetes. 1. ed. New York: Chelsea Hpuse; 2008.
- (13) Papp B, Plath K. Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. Cell Res. 2011;21:486-501.
- (14) Docherty K, Bernardo AS, Vallier L. Embryonic stem cell therapy for diabetes mellitus. Semin Cell Dev Biol. 2007;18:827-38.

- (15) Sadler TW. Langmans Embryologi. 2. ed. København: Munksgaard Danmark; 2006.
- (16) Rao MS, Reddy JK. Pancreatic stem cells: differentiation options. Stem Cell Rev. 2005;1:265-71.
- (17) Edlund H. Pancreas: how to get there from the gut? Curr Opin Cell Biol. 1999;11:663-8.
- (18) Docherty K. Growth and development of the islets of Langerhans: implications for the treatment of diabetes mellitus. Curr Opin Pharmacol. 2001;1:641-50.
- (19) Hebrok M, Kim SK, St Jacques B, McMahon AP, Melton DA. Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. Development. 2000;127:4905-13.
- (20) Hebrok M, Kim SK, Melton DA. Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. Genes Dev. 1998;12:1705-13.
- (21) Kim SK, Hebrok M. Intercellular signals regulating pancreas development and function. Genes Dev. 2001;15:111-27.
- (22) Kim SK, Hebrok M, Melton DA. Notochord to endoderm signaling is required for pancreas development. Development. 1997;124:4243-52.
- (23) Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. Development. 2002;129:2447-57.
- (24) Jiang W, Shi Y, Zhao D, Chen S, Yong J, Zhang J, Qing T, Sun X, Zhang P, Ding M, Li D, Deng H. In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. Cell Res. 2007;17:333-44.
- (25) D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, Moorman MA, Kroon E, Carpenter MK, Baetge EE. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. 2006;24:1392-401.
- (26) Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazer S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK, Baetge EE. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. Nat Biotechnol. 2008;26:443-52.
- (27) Assady S. Challenges and prospects for stem cell-based therapy in diabetes mellitus. Isr Med Assoc J. 2009;11:212-5.

- (28) Matveyenko AV, Georgia S, Bhushan A, Butler PC. Inconsistent formation and nonfunction of insulin-positive cells from pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells in athymic nude rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;299:E713-20.
- (29) Yechoor V, Chan L. Gene therapy progress and prospects: gene therapy for diabetes mellitus. *Gene Ther.* 2005;12:101-7.
- (30) Mortensen HB. Kunstig bugspytkirtel, medicinsk baggrund. JDRF Fonden for diabetesforskning; 2009 [updated 17. august 2009]; Available from: <http://www.jdrfinfo.dk/da/app-medicinsk-baggrund.htm>.