

Klinische toepassingen van mesenchymale stamcellen bij hematopoëtische stamceltransplantatie

Auteurs H. Roelofs en W.E. Fibbe

Trefwoorden mesenchymale stamcellen, transplantatie, differentiatie, immunomodulatie.

Samenvatting

Cotransplantatie van mesenchymale stamcellen kan een nieuwe behandelingsmodaliteit vormen om de resultaten van stamceltransplantatie te verbeteren. Mesenchymale stamcellen kunnen zich ontwikkelen tot verschillende mesenchymale weefsels zoals beenmergondersteunend stroma.

Mesenchymale stamcellen zijn ook in staat immuunreacties te moduleren. Deze combinatie van eigenschappen maakt de cellen bij uitstek interessant voor toepassing in de setting van autologe en allogene stamceltransplantatie.

(Ned Tijdschr Hematol 2005;2(1):3-7)

Inleiding

Stamcellen zijn per definitie cellen die: 1) in staat zijn zichzelf te vervangen oftewel het vermogen hebben om minstens één dochtercel te produceren met dezelfde eigenschappen als de originele cel; 2) zich kunnen ontwikkelen tot verschillende celtypen en 3) in vivo functionele reconstitutie kunnen geven aan de weefsels die uit deze cellen worden gevormd. Tot enkele jaren geleden beperkte de term stamcellen zich in de klinische praktijk tot de hematopoëtische stamcellen (HSC) die kunnen uitgroeien tot alle celtypen van het hematopoëtische systeem. Deze stamcellen kunnen uit beenmerg of bloed worden geoogst om vervolgens autoloog of allogeen getransplanteerd te worden ter behandeling van een (maligne) hematologische aandoening. Voor therapeutische toepassingen worden momenteel naast HSC in toenemende mate ook andere stamcellen gebruikt waaronder de mesenchymale stamcellen (MSC).

In het embryo wordt het ontwikkelende steunweefsel aangeduid met de term mesenchym. Dit steunweefsel komt voornamelijk voort uit het mesoderm en groeit uit tot de volwassen steunweefsels zoals bot, kraakbeen, pees en skeletspier. In dit ontwikkelende steunweefsel bevinden zich de MSC. Behalve in het embryo komen MSC ook voor in foetaal weefsel en in weefsel van volwassen individuen. Meer dan dertig

jaar geleden beschreven Friedenstein et al. reeds dat uit volwassen beenmerg adherente fibroblastachtige celpopulaties konden worden gekweekt die de capaciteit hadden zich te kunnen ontwikkelen tot verschillende typen steunweefsels zoals kraakbeen, bot, vetweefsel en beenmergondersteunend stroma.¹

De gedachte was dat deze verschillende celtypen voortkwamen uit een multipotente voorlopercel, mogelijk zelfs een stamcel. Pittenger et al. hebben het multipotente karakter van deze voorlopercel bevestigd door te laten zien dat subklonen van deze fibroblastachtige celpopulaties individueel in staat zijn om uit te groeien tot de verschillende mesenchymaal gedifferentieerde celtypen.² Hoewel in de meeste gevallen de in vivo reconstitutie-eigenschappen van deze cellen niet zijn onderzocht, worden dit soort voorlopercellen in de literatuur MSC genoemd.

Isolatie en immunofenotypering

MSC worden in de regel verkregen doordat de cellen adhereren aan plastic en een hoge expansiecapaciteit hebben. De geëxpandeerde spoelvormige cellen vertonen een specifiek expressieprofiel van membraanmarkers zoals VCAM-1 (CD106), verschillende varianten van ICAM (CD50, -54, -102), endogline (CD105), Thy-1 (CD90) en CD73. De cellen zijn

negatief voor de hematopoëtische (stam)celmarkers CD34 en -45, PECAM (CD31), costimulatoire moleculen (CD80 en -86) en voor selectines (onder andere CD62). Voor een uitgebreid panel zie Pittenger et al. en Deans et al.^{2,3} Geen van de markers is echter uniek voor geëxpandeerde MSC. Op dit moment is er nog geen specifiek expressieprofiel bekend van de in vitro expandeerbare cellen in het primaire materiaal. Hierdoor wordt het onderzoek naar de functionele eigenschappen en de verschillen met de geëxpandeerde tegenhangers van deze cellen bemoeilijkt.

Bronnen

Behalve in het volwassen beenmerg komen MSC ook voor in vele andere volwassen weefsels zoals het beenvlies en spierbindweefsel. Het voorkomen van MSC in (cytokinegemobiliseerd) bloed is op dit moment nog onderwerp van discussie.⁴ In de foetus komen MSC voor in bloed, lever, beenmerg en in de longen en recent zijn MSC geïdentificeerd in vruchtwater en navelstrengbloed.⁵⁻⁹ Verdunningsexperimenten hebben echter aangetoond dat de frequentie van MSC aanzienlijk verschilt van weefsel tot weefsel.

Naast een weefselafhankelijke frequentie is de frequentie van MSC ook afhankelijk van de leeftijd. Geschatte frequenties van MSC in het beenmerg van een pasgeborene is 1/10.000 kernhoudende cellen terwijl deze frequentie bij senioren 100 maal lager ligt.¹⁰ Ook de hoeveelheid primair materiaal die kan worden verkregen en de expansiecapaciteit van de daarin aanwezige MSC verschilt aanzienlijk van weefsel tot weefsel.

Het gebruik van foetale weefsels is omgeven door ethische vragen en wisselend politiek draagvlak. Derhalve is op dit moment slechts een beperkt aantal weefsels geschikt voor klinische toepassing.

Functionele eigenschappen

Differentiatie

MSC hebben de capaciteit om zich te ontwikkelen tot osteoblasten, chondro- en adipocyten.² Onder invloed van dexamethason en ascorbinezuur worden humane MSC aangezet tot expressie van alkalische fosfatase. Dit kan worden aangetoond met de standaard histochemische kleuring Fast Blue. Onder dezelfde kweekomstandigheden kan in aanwezigheid van β -glycerofosfaat ook calciumdepositie optreden. Dit proces kan aangetoond worden met een alizarineroodkleuring. In afwezigheid van serum en

aanwezigheid van 'transforming growth factor'- β (TGF- β) kan chondrocytendifferentiatie worden geïnduceerd. Differentiatie in deze richting wordt gewoonlijk aangetoond door een immunohistochemische kleuring voor collageen type II.

Kweken in de aanwezigheid van 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethason, insuline en indomethasine induceert differentiatie tot adipocyten. Binnen een week zijn de lipiderijke vacuolen die aankleuren met Oil Red O al duidelijk zichtbaar. De vacuolen vermeerderen en verenigen zich tot de hele cel gevuld is. Deze eenvoudige in vitro tests worden gewoonlijk gebruikt om de MSC-populaties te karakteriseren. In vivo kunnen MSC zich ook ontwikkelen tot osteoblasten, chondro- en adipocyten en ook tot celtypen die niet in het beenmerg gevonden worden zoals cardiomyocyten.¹¹

Verfaillie et al. hebben nog een andere celpopulatie gevonden die gekweekt kan worden uit het volwassen beenmerg van mens, rat en muis en die een meer uitgebreide differentiatiecapaciteit laat zien: de multipotente volwassen voorlopercellen (MAPC).^{12,13} In tegenstelling tot de MSC kunnen deze cellen langdurig gekweekt worden en de voorlopercellen kunnen zich ontwikkelen tot celpopulaties van endodermale, mesodermale en ectodermale oorsprong.

Experimenten bij muizen hebben aangetoond dat deze MAPC ook in vivo een zeer uitgebreid differentiatiespectrum hebben. Genetisch gemerkte MAPC die geïnjecteerd werden in de blastocyst ontwikkelden zich tot vrijwel alle somatische celtypen. Intraveneuze toediening van MAPC resulteerde in zowel hematopoëtische cellen in beenmerg, bloed en milt als in epitheliale cellen in long, darm en lever. Op dit moment is het echter nog onduidelijk of de MAPC een zeer zeldzame subpopulatie vormen die aanvankelijk wordt geïsoleerd tezamen met de MSC of dat de uitgebreide differentiatiecapaciteit wordt verkregen als gevolg van de in vitro expansie.

De capaciteit van MSC om zich te ontwikkelen tot een verscheidenheid aan celtypen ligt aan de basis van onderzoek naar de toepassing van deze cellen in vele regeneratieve therapieën. Dit overzicht beperkt zich tot de differentiatie van MSC in hematopoëse-ondersteunend stroma en de toepassingen bij HSC-transplantaties.

Immunomodulatie

MSC initiëren zelf geen T-celrespons.¹⁴⁻¹⁶ Ze zijn zelfs in staat om op een dosisafhankelijke wijze de

T-celproliferatie in vitro te onderdrukken.¹⁵⁻¹⁸ Het mechanisme van dit immunomoduloire effect van MSC is nog onbekend. De meeste studies wijzen op een rol voor oplosbare factoren, ofwel responsstimulerende factoren die door de MSC worden weggenomen dan wel responsreducerende factoren die door de MSC worden geproduceerd.¹⁶⁻¹⁹ De bevindingen ondersteunen de gedachte dat MSC ook als derde partij, dat wil zeggen niet afkomstig van donor of ontvanger van een HSC-transplantaat, hun immunomoduloire functie kunnen uitoefenen.

MSC en transplantatie

In vitro studies

Stromale cellen in het beenmerg zijn van groot belang voor de ontwikkeling en regulatie van de hematopoëse vanwege de productie van hematopoëtische groeifactoren, matrixeiwitten en het verzorgen van cel-celinteracties. Dit gegeven was aanleiding om HSC in vitro te expanderen op een voedingslaag van stromale cellen.

Recenter bleek dat ook geëxpandeerde MSC de eigenschap hebben om op vergelijkbare wijze HSC-kweken te stimuleren.²⁰ In een HSC-transplantatie-setting is de stromale component van het beenmerg praktisch altijd gecompromitteerd door de chemo- of bestralingstherapie, of door de conditionering. Dit beperkt mogelijk de uitgroei van donor-HSC in de ontvanger. Bovendien blijven de stromale cellen na een conventionele allotransplantatie voor een hematologische aandoening gewoonlijk van de ontvanger-origine. Dit komt mogelijk door het zeer beperkte aantal MSC in het transplantaat.

Deze gegevens en het feit dat de MSC kunnen differentiëren tot stromale cellen alsook in staat zijn T-celreacties te onderdrukken, vormen de basis om geëxpandeerde MSC in te zetten voor HSC-transplantaties. Het doel hiervan is om de 'graft-versus-host disease' (GvHD) te beperken en de uitgroei van HSC in de ontvanger te stimuleren zodat het hematopoëtische herstel wordt bevorderd.

Voor beide toepassingen zijn er aanwijzingen dat MSC van een derde partij gebruikt kunnen worden.

Preklinisch onderzoek

De afgelopen jaren is veel onderzoek verricht in diermodellen om de haalbaarheid en het principe van MSC-transplantatie te testen. Cotransplantatie van humane MSC/HSC in een pre-immuun foetaal schapenmodel en in een NOD/SCID-muismodel resulteerde in een verhoogde innesteling van humane

hematopoëtische cellen in het beenmerg.^{21,22} In de studie van Noort et al. was dit effect van MSC het meest prominent bij de transplantatie van lage aantallen HSC. Dit resultaat geeft aan dat klinische toepassing van MSC in de transplantatiesetting mogelijk vooral interessant is in gevallen waar de hoeveelheid HSC beperkt is zoals bij transplantaties van navelstrengbloed bij volwassenen.

Infusie van MSC in een apenmodel voor huidafstoting liet een langere transplantatoeverleving zien in vergelijking met controledieren die niet getransplanteerd werden met MSC. Dit geeft aan dat MSC ook in vivo een immuunsuppressieve functie kunnen uitoefenen.¹⁵ Daarentegen hebben resultaten van een muismodel aangetoond dat co-injectie van MSC en s.c. geïnjecteerde melanoomcellen de tumorgroei in allogene ontvangermuizen bevordert.²³ Naast de zeer bemoedigende preklinische resultaten is er dan ook reden tot voorzichtigheid bij de klinische implicatie van MSC-transplantatie.

Klinisch onderzoek

Klinische studies hebben reeds aangetoond dat het oogsten en ex vivo expanderen van MSC voor toediening aan de patiënt praktisch uitvoerbaar is en dat het celproduct op veilige wijze kan worden toegediend aan patiënten met een hematologische maligniteit. Hoeveelheden MSC tot 2×10^6 /kg lichaamsgewicht van de ontvanger zijn klinisch getest.^{24,25} Toediening van hogere celdoses zijn echter technisch haalbaar.

Frassoni et al. hebben een cotransplantatiestudie verricht bij 31 patiënten die vanwege een hematologische maligniteit een HLA-identiek HSC/MSCTransplantaat ontvingen van een broer of zus.²⁵ De auteurs konden donorhematopoëse aantonen bij alle patiënten. Vergeleken met een historische controlegroep was er 6 maanden na transplantatie een significante reductie van de incidentie van zowel acute als chronische GvHD (respectievelijk $p=0,002$ en $p=0,02$, 'log rank' test) en een verhoogde overleving (respectievelijk 96 en 68%). Ze vonden geen verschillen in de recidiefrequentie van de onderliggende hematologische maligniteit. De vervolgtijd van de studie was echter beperkt. Alhoewel er geen argumenten zijn tegen het gebruik van derdepartij-MSCTransplantatie in een dergelijk cotransplantatieprotocol, is daarover tot op heden nog niet gerapporteerd.

Met betrekking tot MSC-transplantatie als interventie therapie bij GvHD is er recent een interessante patiëntencasus verschenen.²⁶ De auteurs beschrijven een ernstige onbehandelbare (steroïdresistente) acute GvHD (graad IV) bij een 9-jarige jongen na een

Aanwijzingen voor de praktijk

1. Mesenchymale stamcellen kunnen zich in vitro en in vivo ontwikkelen tot verschillende mesenchymale celtypen zoals osteoblasten, chondro- en adipocyten, en beenmergondersteunend stroma.
2. Mesenchymale stamcellen kunnen in vitro en in vivo de T-celgemedieerde immuunreacties onderdrukken.
3. Mesenchymale stamcellen kunnen worden verkregen uit relatief makkelijk toegankelijke bronnen zoals beenmerg, vruchtwater en navelstrengbloed.
4. Mesenchymale stamcellen kunnen worden toegepast in zowel de autologe als de allogene transplantatiepraktijk (momenteel in klinische studiefase I en II).

HSC-transplantatie van een ongerelateerde donor waarbij voor de behandeling geëxpandeerde MSC van de moeder (derde partij) werden gebruikt. MSC-infusie leidde tot een sterke afname in de ernst van de GvHD.

Conclusie

Transplantatie van MSC is een vorm van celtherapie die nieuwe mogelijkheden biedt ter verbetering van de transplantatiepraktijk. In de autologe setting zijn de toepassingen gericht op de innestelingsbevordering van de transplantaatcellen en de daarmee samengaannde versnelde ontwikkeling van functionele hematopoëse.

De toepassing van MSC in de allogene setting richt zich tevens op de immunomoduloire eigenschappen waardoor het mogelijk is GvHD te bestrijden. Klinische studies geven aan dat de MSC kunnen worden geëxpandeerd en veilig toegediend. In vergelijking met historische controles hebben de nieuwe behandelmethoden met MSC bemoedigende resultaten opgeleverd.

Uit de klinische data die tot dusver zijn verkregen, kunnen echter geen conclusies worden getrokken met betrekking tot de effectiviteit van de nieuwe behandelmethodes. Om de doeltreffendheid van zowel MSC/HSC-cotransplantaties als de behandeling van GvHD met MSC te bestuderen, zijn gerandomiseerde klinische studies van voldoende omvang van essentieel belang. Alleen indien de transplantatie-instituten hun krachten bundelen in multicenterstudies kunnen duidelijke conclusies getrokken worden op basis van

datasets van voldoende omvang. Op dit moment wordt in de 'European group for Blood and Bone Marrow Transplantation' (EBMT) een universeel MSC-expansieprotocol voorbereid om te komen tot een gestandaardiseerd klinisch MSC-product.

Referenties

1. Friedenstien AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, 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.
2. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
3. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000;28:875-84.
4. Roufousse CA, Direkze NC, Otto WR, Wright NA. Circulating mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:585-97.
5. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-Van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 2003;102:1548-9.
6. In 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-Van der Keur C, Kruisselbrink AB, Van Bezooijen RL, et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 2003;88:845-52.
7. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone

marrow. *Blood* 2001;98:2396-402.

8. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;109:235-42.

9. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004;103:1669-75.

10. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994;21:429-35.

11. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002;105:93-8.

12. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-9.

13. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001;98:2615-25.

14. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003;31:890-6.

15. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002;30:42-8.

16. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003;75:389-97.

17. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T-cells to their cognate peptide. *Blood* 2003;101:3722-9.

18. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002;99:3838-43.

19. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004;103:4619-21.

20. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998;176:57-66.

21. Almeida-Porada G, Flake AW, Glimp HA, Zanjani ED. Cotransplantation of stroma results in enhancement of engraftment and early expression of donor hematopoietic stem cells in utero. *Exp Hematol* 1999;27:1569-75.

22. Noort W, Kruisselbrink A, In 't Anker P, Kruger M, Van

Bezooijen R, De Paus R, et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2002;30:870-8.

23. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003;102:3837-44.

24. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. 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;16:557-64.

25. Frassonni F, Labopin M, Bacigalupo A. Expanded mesenchymal stem cells (MSC), co-infused with HLA identical hemopoietic stem cell transplants, reduce acute and chronic graft versus host disease: a matched pair analysis. *Bone Marrow Transplant* 2002;29(Suppl 2).

26. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gothelstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363:1439-41.

Ontvangen 19 juli 2004, geaccepteerd 24 november 2004.

Correspondentieadres

Mw. dr. H. Roelofs, translationeel onderzoeker

Leids Universitair Medisch Centrum
Centrum voor stamceltherapie
Afdeling Immunohematologie en Bloedtransfusie (IHB)
Postbus 9600
2300 RC Leiden
Tel.: 071 526 31 38
Fax: 071 521 67 51
E-mail: h.roelofs@lumc.nl

Prof. dr. W.E. Fibbe, hematoloog

Leids Universitair Medisch Centrum
Afdeling Hematologie en afdeling IHB

Correspondentie graag richten aan de eerste auteur.

Belangenconflict: geen gemeld.
Financiële ondersteuning: geen gemeld.