

Op weg naar stamcelonderzoek zonder proefdieren

Daniela Salvatori

D.C.F.Salvatori@lumc.nl

Stamcelonderzoek bevindt zich in een enorme stroomversnelling, maar maakt gebruik van enorme aantallen proefdieren. Daniela Salvatori, proefdierpatholoog aan het LUMC, onderzoekt mogelijkheden om dit drastisch te verminderen.

Achtergrond

Dr Daniela Salvatori is de verantwoordelijke dierenarts binnen de proefdierfaciliteiten van het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC) en de Universiteit Leiden. Zij is European “certified veterinary animal pathologist” en zij leidt de Proefdierpathologie Unit van het LUMC. Zij is ook lid van de LUMC Instantie voor Dierwelzijn (IvD).

Haar onderzoekswerk wordt sinds 2013 ondersteund door het ZonMW programma ‘Meer Kennis met Minder Dieren (MKMD), welke de drie V’s als doelstelling heeft: Vervanging, Vermindering en Verfijning van proefdiergebruik. Ze heeft in 2013 en 2017 twee subsidies gekregen, elk ter grootte van 300.000 euro. Het onderzoek heeft als doel om de verplichte muizentest te vervangen (in vivo teratoma assay) die nodig is om pluripotentie en kwaadaardigheid van humane stamcellen te testen voor deze mogen worden toegepast in de mens. De subsidies zijn verkregen in samenwerking met de stichting Proefdiervrij NL, het bedrijf GenomeScan, en de stichting Fondazione Guido Bernardini uit Italië.

Het onderzoek

Voordat een stamcellijn kan worden gebruikt voor stamceltherapie in de mens moet onomstotelijk zijn vastgesteld dat die cel zich daadwerkelijk kan ontwikkelen tot alle soorten >>

Woordenlijst

Pluripotentie — het vermogen van een stamcel om alle soorten cellen te vormen die een individu bezit.

Teratoma — tumoren die weefsels of orgaancomponenten bevatten uit alle drie de kiemlagen. Kiemlagen zijn de primaire cellagen die gevormd worden in een embryo (endoderm, mesoderm en ectoderm).

Teratoma assay — Test waarbij immunodeficiënte muizen met stamcellen worden geïnjecteerd om te bepalen of de tumoren die hierbij gevormd worden inderdaad afgeleiden bezitten van alle drie de kiemlagen (teratoma). De tumoren worden ook geanalyseerd voor kenmerken van kwaadaardigheid.

weefseltypen (pluripotentie), en dus een echte stamcel is en ook niet kwaadaardig is. De huidige gouden standaard om dat te onderzoeken is een dierproef. Muizen worden ingespoten met stamcellen om te kijken of ze uitgroeien tot (ongewenste) teratomen, tumoren die uit verschillende weefseltypen bestaan. Ons onderzoek is geheel gewijd aan de ontwikkeling van een moleculaire genetische karakteriseringsmethode als alternatief voor de dierproef.

Stamcellen moeten eerst op deze eigenschappen getest worden voordat nieuwe cellijnen kunnen worden geregistreerd en nieuwe kandidaten voor celtherapie kunnen worden goedgekeurd. Embryonale stamcellen (ESCs), welke zich in principe in elk type cel kunnen differentiëren, zijn onmisbaar geworden als hulpmiddel in de biologie, en hebben de weg vrijgemaakt voor op stamcel gebaseerde behandelingen van ziektes bij de mens. Het gebruik van menselijke ESCs is echter ethisch controversieel omdat er embryo's nodig zijn voor het aanmaken van ESCs.

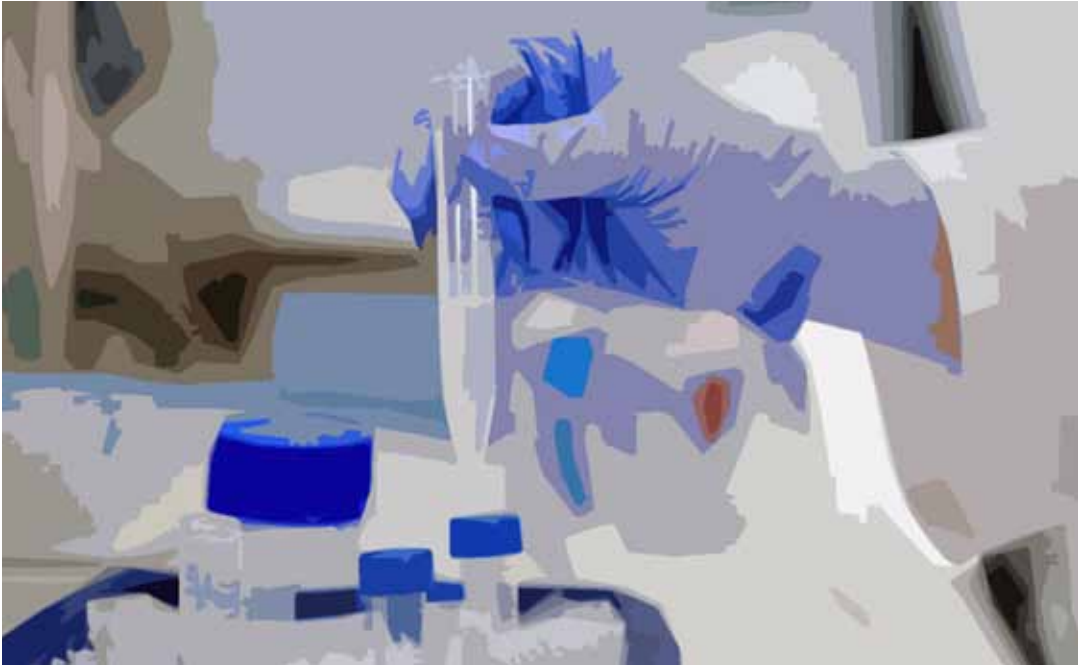
In 2007 hebben Japanse onderzoekers voor een wetenschappelijke doorbraak gezorgd waarbij ze hebben laten zien dat ook menselijke huidcellen opnieuw geprogrammeerd kunnen worden zodat ze pluripotent worden - zogenaamde geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSCs). Voor deze ontdekking hebben zij in 2012 de Nobelprijs gekregen. iPSCs lijken veel op embryonale stamcellen. Ze vernieuwen zichzelf in vitro en, wat belangrijker is, ze kunnen zich differentiëren in vrijwel alle 220 celtypen van het menselijk lichaam. Gezien het feit dat iPSCs van elk individu kunnen worden verkregen, vormen ze een uitgelezen instrument om genetische ziektes te onderzoeken en om medicijnen te testen.

Deze pluripotentie kent echter ook een negatieve kant. In feite is de potentie van de stamcellen een essentiële factor die bijdraagt aan het risico van het vormen van tumoren. De eigenschappen van stamcellen tonen overeenkomsten met de eigenschappen van kankercellen, zoals een lange levensduur, een relatief sterke resistentie tegen apoptosis (geprogrammeerde celdood) en de capaciteit om zichzelf voort te planten over een lange periode. Om die redenen kunnen stamcellen ook transformeren tot kwaadaardige cellen. Bovendien spelen vergelijkbare groeiregulatoren en controlemechanismen een rol bij het in stand houden van zowel kankercellen als stamcellen. Dit is de reden waarom het vormen van tumoren vaak gezien wordt als een obstakel voor veilig gebruik van op stamcellen gebaseerde medische behandeling.

Op iPSC gebaseerde therapieën zijn grote kanshebbers om in de nabije toekomst te worden toegepast bij de behandeling van ziektes zoals Parkinson, suikerziekte of hartinfarct. Immers, de stamcel groeit uit tot de gewenste nieuwe cel en kan dan beschadigd weefsel herstellen. Deze technologie schept ook nieuwe mogelijkheden voor patiëntgerichte celtherapieën om verouderingsziektes te behandelen en/of andere weefselbeschadigingen te herstellen.

Een recent IMI (Innovative Medicine Initiative) onderzoek van de Europese Unie, medegefinancierd door de vijf grootste farmaceutische bedrijven van Europa, vereiste de aanmaak van duizenden stamcellijnen in één enkel project. De NIH (VS) en de Wellcome Trust (GB) hebben eveneens grootschalige human iPSC (hiPSC) banking programma's gepland staan of zijn er al mee bezig. Deze enorme toename in het aantal aangemaakte hiPSCs is deels te danken aan het feit dat het herprogrammeren technisch betrekkelijk eenvoudig is.

De Europese stamcelbank heeft als doel om voor 2020 10.000 verschillende hiPSC cellijnen te produceren. De gouden standaardmethode om te bepalen of hiPSC pluripotent zijn, maakt gebruik van de muis-teratoma assay. Elke hiPSC cellijn moet op pluripotentie en



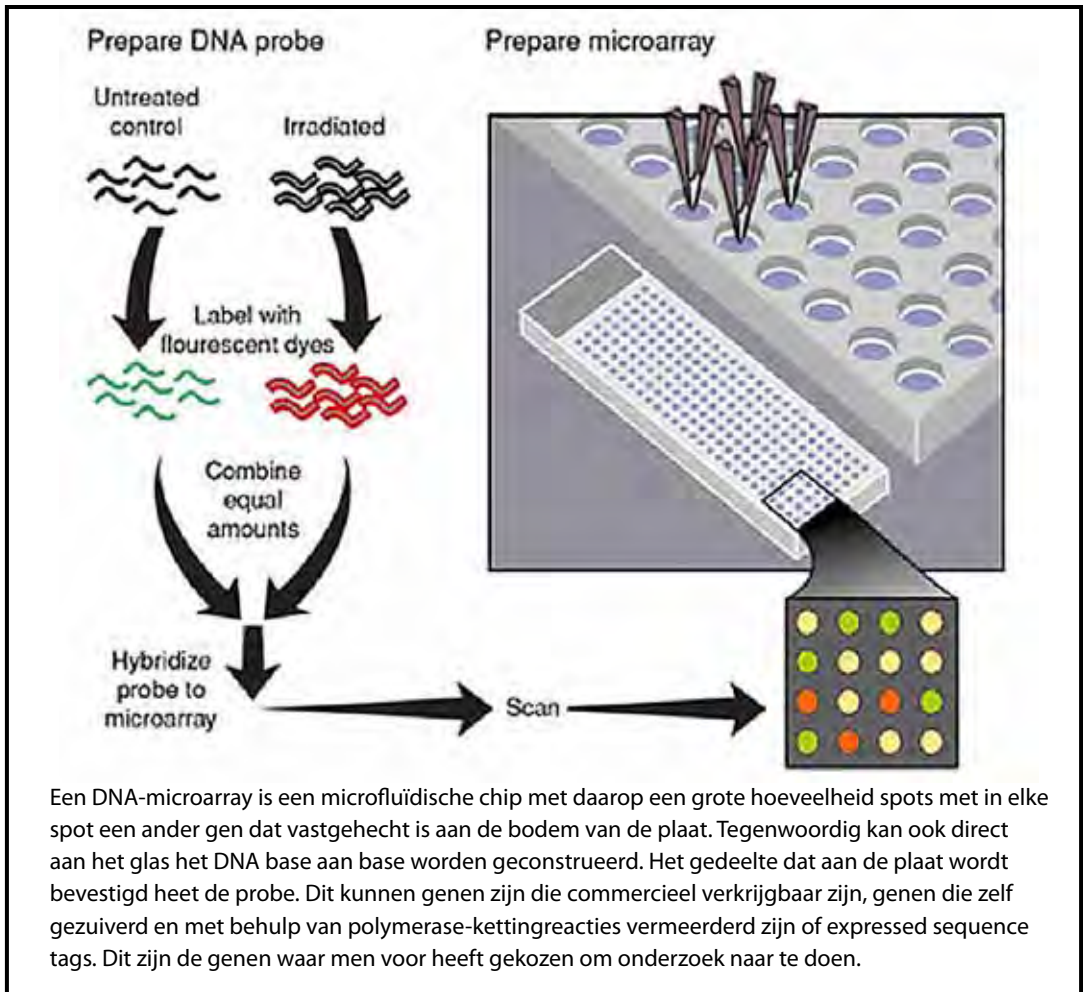
kwaadaardigheid worden getest. Gewoonlijk worden er 3 tot 4 klonen gegenereerd per cellijn, en elke kloon wordt op zijn minst in drie muizen geïnjecteerd. Hiervoor zijn dus in totaal (10,000 cellijnen x 4 klonen x 3 muizen) 120.000 muizen nodig; een enorm aantal!

Vanwege de afhankelijkheid van muizen, het gebrek aan kwantitatieve resultaten en andere nadelen (zie verder), wordt door wetenschappers sterk getwijfeld aan de bruikbaarheid van de teratoma-test. Deze muis-assay roept belangrijke ethische vragen op over dierenwelzijn. De dieren kunnen snel uitzaaiende tumoren ontwikkelen en de in-vivo groei van tumoren kan heel pijnlijk zijn. De test kent ook nog ernstige bijkomende beperkingen, zowel op het gebied van de experimentele procedure als met betrekking tot de wetenschappelijke kwaliteit van de gegenereerde data. Het is arbeidsintensief, tijdrovend en duur, en het vereist een groot aantal immunodeficiënte muizen die ernstig ongerief kunnen ondervinden, terwijl ze in IVC's of isolatoren moeten worden gehuisvest voor een periode van minimaal twee tot drie maanden.

Bovendien is de test nooit gestandaardiseerd, noch ten aanzien van de locatie van injectie (bijvoorbeeld onder de huid, in de testikel, tussen de spieren), noch met betrekking tot het muizenras (bijvoorbeeld NOD-SCID of beige SCID muizen), of het volume van de geïnjecteerde celsuspensie, of de tijdsduur waarin de tumoren zich ontwikkelen. Er zijn anekdotische meldingen dat al deze factoren het resultaat kunnen beïnvloeden, maar er hebben geen uitgebreide vergelijkingen plaatsgevonden. Bovendien vergt de analyse van teratoma's goed opgeleide deskundigheid op het vlak van histopathologie. Kwantificatie van de test is moeilijk en daar is zelden of nooit een poging toe gedaan.

Dr. Salvatori heeft recentelijk een artikel gepubliceerd over het testen van pluripotentie in vitro in het vakblad *Stem Cell Reports*, waarin zij laat zien dat de combinatie van twee verschillende in vitro testen, één gebaseerd op PCR en de andere op microarray, de in vivo test goed kunnen vervangen. Bovendien zijn deze twee assays veel makkelijker en sneller te gebruiken, en geven ze kwantitatieve, dus meetbare resultaten. Aangezien de productie van »

menselijke iPSCs exponentieel toeneemt, zal het inzetten van de twee *in vitro* assays tot een sterke daling van het aantal benodigde muizen kunnen leiden. Er wordt verwacht dat de aanbevelingen die uit dit onderzoek voortkomen door stamcelonderzoekers breed geaccepteerd zullen worden.



Het recente, door ZonMW gesubsidieerde onderzoek van Salvatori heeft als doel een op micro-RNA gebaseerde *in vitro* test te ontwikkelen en te valideren, die in staat is om de kwaadaardigheid van stamcellen te voorspellen, en zodoende de teratoma-test te vervangen. Micro-RNA is een vorm van niet-coderend RNA (ribonucleïnezuur) van 20 tot 25 nucleotiden lang, en is onderdeel van de epigenetische (*omkeerbare erfelijke veranderingen, red.*) mechanismen die de expressie van genen reguleren. Micro-RNA kan door cellen geproduceerd worden en in bloed terecht komen.

Onze voorlopige gegevens tonen aan dat micro-RNA's die worden ingezet voor de diagnose van menselijke tumoren (germ cells tumors) inderdaad vrijkomen in het bloed van muizen met uit kwaadaardige stamcellen afgeleide tumoren. Dezelfde micro-RNAs worden gevonden in cellen die *in vitro* gecultiveerd zijn. Deze resultaten hebben de weg geplaveid om *in vitro* gecultiveerde stamcellen te testen op kwaadaardigheid zonder het gebruik van proefdieren.

«