

All'attenzione della Fondazione Diabete Ricerca

Relazione finale per la borsa di studio per il
“Bando di Concorso Fondazione Diabete Ricerca 2015”

Progetto della Dott.ssa Pellegrini Silvia

Nuove β cellule dalla cute: strategie innovative per incrementare l'efficienza di differenziamento pancreatico delle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC)

Introduzione

Nei pazienti con diabete le β cellule pancreatiche sono numericamente o funzionalmente insufficienti e la loro sostituzione con cellule producenti insulina rappresenta una possibile cura per questa patologia. Grandi speranze per una terapia di sostituzione β cellulare alternativa sono riposte nel differenziamento di cellule staminali, in particolare quelle pluripotenti indotte (iPSC) (Takahashi et al., 2007), in quanto possiedono, rispetto alle staminali adulte, maggiori capacità proliferative e differenziali (Calafiore & Basta, 2015) e, rispetto alle cellule staminali embrionali, consentono di ottenere cellule secernenti insulina autologhe, derivate dalla riprogrammazione e dal successivo differenziamento di cellule somatiche dello stesso individuo.

Nel nostro laboratorio abbiamo recentemente ottenuto il differenziamento di iPSC umane in cellule in grado di produrre e secernere insulina con un protocollo che riproduce *in vitro* ogni passaggio dell'organogenesi pancreatico (Pellegrini et al., 2015). Due limiti fondamentali di questa strategia sono l'efficienza di differenziamento e il potenziale rischio di trasformazione neoplastica delle cellule non correttamente differenziate; abbiamo infatti dimostrato che le cellule pancreatiche derivate dal differenziamento di iPSC, quando trapiantate in topi immunodeficienti, attecchiscono e producono insulina, ma sono presenti anche cellule differenziate in altri tipi cellulari e cellule pluripotenti con potenziale oncogenico. È quindi necessario lo sviluppo di nuove strategie che consentano di aumentare l'efficienza di differenziamento e la sicurezza delle β cellule generate.

Scopo

L'obiettivo di questo progetto è quindi quello di ottenere β cellule a partire da iPSC umane con alta efficienza e trovare nuove strategie che consentano di selezionare solo le cellule differenziate in cellule pancreatiche.

Piano sperimentale e risultati ottenuti

Fase 1: implementare il protocollo di differenziazione mediante l'utilizzo di nuove molecole e fattori di crescita.

In questi 12 mesi, provando varie condizioni e fattori di crescita, è stato messo a punto un nuovo protocollo di differenziamento (Figura 1) combinando fra loro:

- un nuovo kit commerciale per il primo stadio del differenziamento (StemDiff Definitive Endoderm kit, STEMCELL®) in grado di differenziare cellule staminali in cellule dell'endoderma definitivo con alta efficienza e riproducibilità.
- nuove citochine e fattori di crescita descritti recentemente in alcuni lavori in cui viene ottenuto il differenziamento di cellule staminali embrionali (ESC) in β cellule con alta efficienza (Pagliuca et al., 2014; Rezanian et al., 2014).

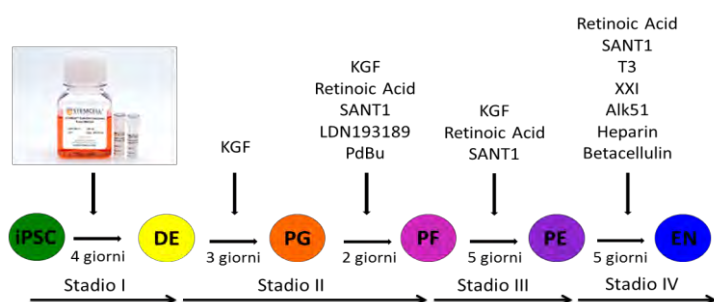


Figura 1: Schema rappresentativo del protocollo di differenziamento con citochine, fattori di crescita e i giorni di differenziamento necessari per ogni stadio. iPSC: cellule pluripotenti; DE: endoderma definitivo; PG: pancreatic gut tube; PF: intestino primitivo posteriore; PE: endoderma pancreatico; EN: cellule endocrine.

Questo protocollo di differenziamento è stato provato su due diversi cloni (clone #5 e #9) di iPSC ottenute mediante riprogrammazione (con vettori virali del Sendai virus, che non integrano i fattori di riprogrammazione all'interno del genoma della cellula ospite) di fibroblasti umani adulti di un soggetto sano. Adesso, al fine di approssicare una possibile traslazione clinica, abbiamo iniziato a lavorare con una nuova linea di iPSC (Catapult) generata in condizione di GMP (Good Manufacturing Practice) con plasmidi non integranti da cellule del sangue (CD34+ arricchite) di un donatore sano (collaborazione con Cell and Gene Therapy Catapult, UK).

I risultati ottenuti dimostrano che, a livello di espressione genica, otteniamo durante il differenziamento di tutti e 3 i cloni la down-regolazione della pluripotenza (come indicato diminuzione dell'espressione del gene Nanog) e un aumento e una stabile espressione di importanti fattori di trascrizione pancreatici come Pdx1 e Nkx6.1 e, soprattutto, un'augmentata espressione dell'mRNA dell'insulina (Figura 2). Nei differenziamenti con le iPSC Catapult è stato aggiunto un ulteriore stadio del differenziamento per consentire la maturazione delle cellule endocrine insulino-positive generate. Durante questo stadio le cellule sono state coltivate nel terreno utilizzato per la coltura delle isole pancreatiche (Final Wash) contenente 10% FBS, 10 μ M di Alk5inhibitor e 1 μ M di T3. Tutti i dati sono stati confrontati con l'espressione genica di preparati di isole pancreatiche (HI, purezza >60%).

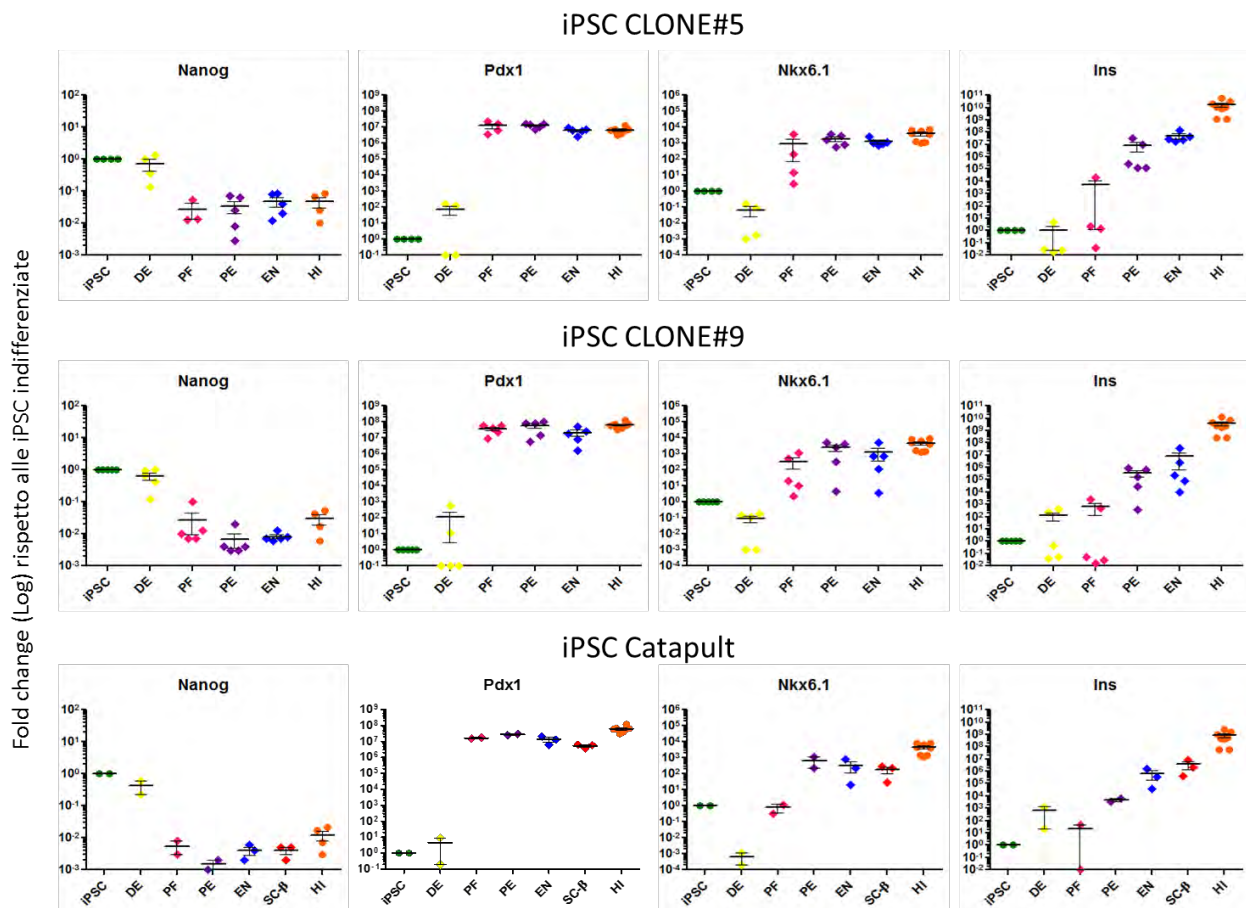
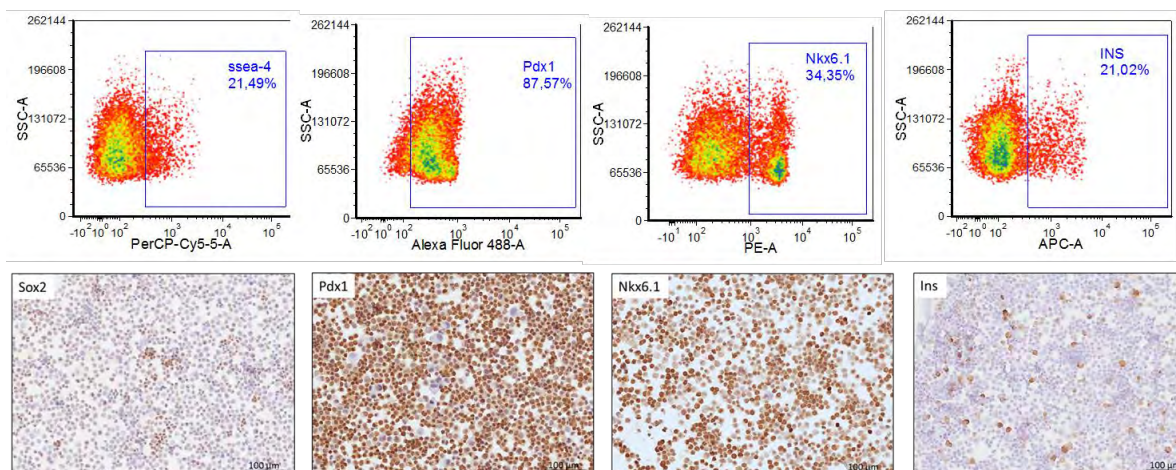


Figura 2: Dotplots rappresentativi dei valori di espressione genica in Taqman di marcatori di pluripotenza (Nanog), di endoderma pancreatico (Pdx1 e Nkx6.1) e di cellule endocrine (Ins) in tre diversi cloni di cellule iPS. I livelli di espressione genica sono stati misuranti durante 5 fasi che corrispondono ad altrettanti passaggi dell'organogenesi pancreaticca (iPSC: cellule pluripotenti; DE: endoderma definitivo; PF: intestino primitivo posteriore; PE: endoderma pancreatico; EN: cellule endocrine) e normalizzati rispetto alle cellule iPSC indifferenziate. Tutti i dati sono stati confrontati con l'espressione genica di isole pancreatiche (HI). Ogni punto rappresenta un esperimento indipendente.

Le cellule terminalmente differenziate ottenute da entrambi i cloni sono inoltre risultate esprimere proteine come Insulina, Nkx6.1, Nkx2.2 e Pdx1 (in immunostochimica e citometria a flusso), marcatori distintivi delle β cellule, ma anche marcatori della pluripotenza come Sox2 o Ssea-4 (Figura 3).

iPSC CLONE#5



iPSC CLONE#9

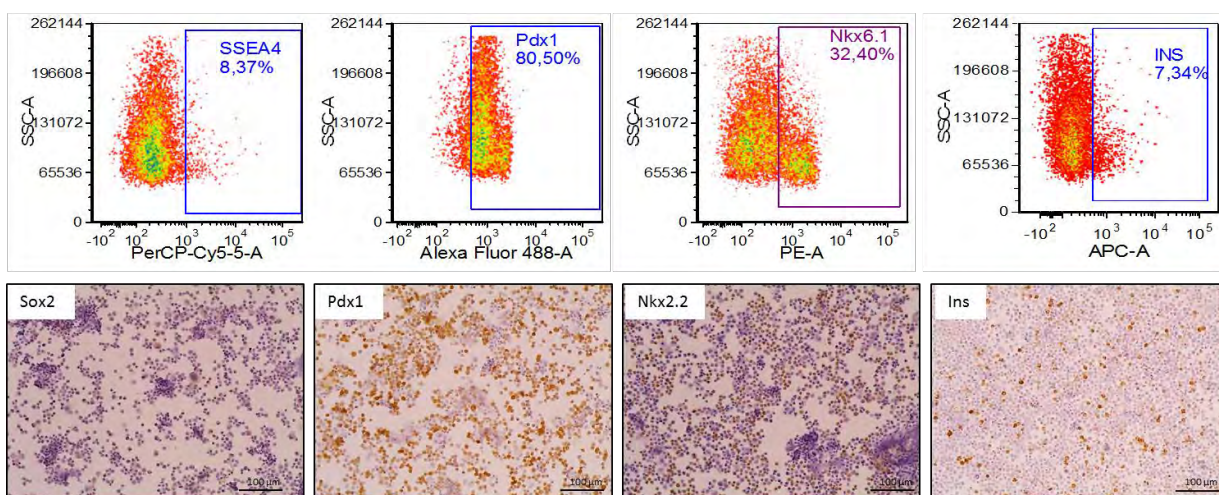


Figura 3: Analisi dell'espressione proteica di marcatori di pluripotenza (Ssea-4 e Sox2), di endoderma pancreatico (Pdx1, Nkx6.1 e Nkx2.2) e di cellule endocrine (Ins) in due diversi cloni di cellule iPS mediante citometria a flusso (sopra) e immunistochimica (sotto).

Le iPSC Catapult sono inoltre state caratterizzate in citofluorimetria durante tutti gli stadi del differenziamento per l'espressione di: 1) il marcatore di pluripotenza Oct4, che passa dal 99% delle cellule indifferenziate allo 0% dello stadio terminale; 2) i marcatori di progenitori pancreatici Pdx1 e Nkx6.1, che vengono selettivamente e gradualmente overespressi; 3) insulina, che passa dallo 0% delle iPSC al 20,28% delle cellule terminalmente differenziate (Figura 4).

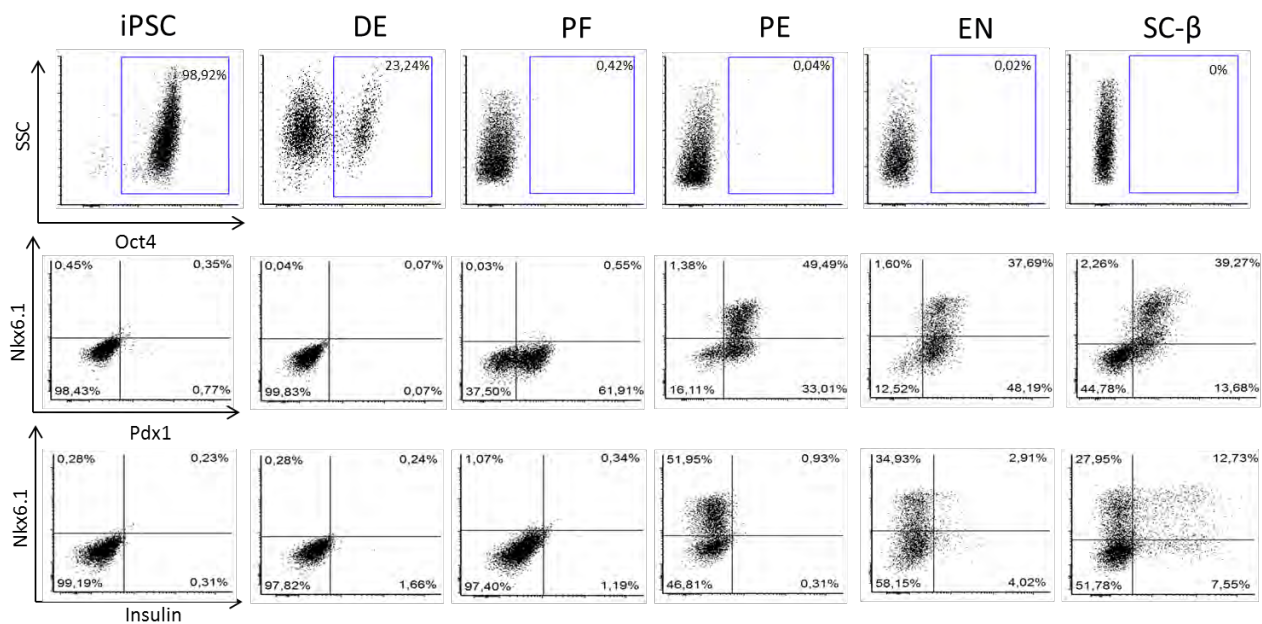


Figura 4: Analisi dell'espressione proteica di marcatori di pluripotenza (Oct4), di endoderma pancreatico (Pdx1 e Nkx6.1) e di cellule endocrine (Ins) durante 6 fasi che corrispondono ad altrettanti passaggi dell'organogenesi pancreatica (iPSC: cellule pluripotenti; DE: endoderma definitivo; PF: intestino primitivo posteriore; PE: endoderma pancreatico; EN: cellule endocrine; SC-β: cellule insulino positive) mediante citometria a flusso.

Le cellule iPSC Catapult terminalmente differenziate sono inoltre in grado, in condizioni di perfusione dinamica, di secernere insulina in risposta allo stimolo di glucosio (Figura 5).

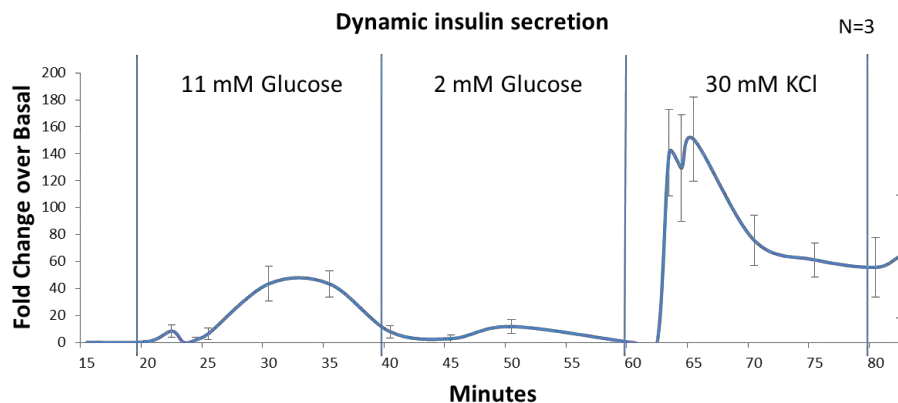


Figura 5: Analisi del profilo di secrezione insulinica in risposta in perfusione dinamica a diversi stimoli di glucosio (2 e 11mM) e di KCl (30mM). Dati rappresentati come media $\pm$ SEM (N=3 esperimenti indipendenti).

Fase 2: implementare il protocollo di differenziazione mediante l'utilizzo di matrici extracellulari.

Durante lo sviluppo embrionale le cellule staminali in differenziamento sono fortemente influenzate dal microambiente che le circonda, che media la loro differenziazione in maniera tessuto-specifica (Chen et al., 2007; Narayanan et al., 2014). Recentemente, in collaborazione con il gruppo del Dr. Orlando presso il Wake Forest Institute for Regenerative Medicine di Winston Salem (USA), abbiamo messo a punto un protocollo che consente di ottenere una matrice pancreaticata extracellulare acellulata (Figura 6) tramite decellularizzazione per perfusione di pancreas umano intero (Peloso et al., 2016).

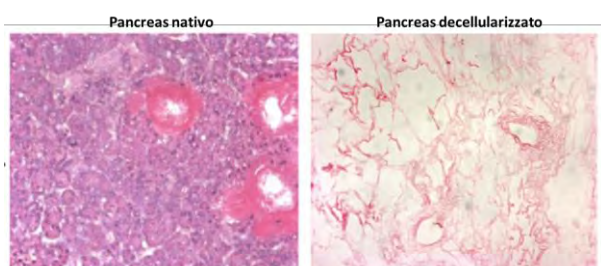


Figura 6. Analisi istologica del pancreas prima e dopo il processo di decellularizzazione. La colorazione con ematossilina/eosina dimostra la completa perdita degli elementi cellulari e la conservazione della struttura intercellulare.

L'obiettivo di questa parte del progetto è verificare se la coltura delle cellule iPSC in differenziamento sulla matrice di pancreas decellularizzato consenta di ottenere una maggior efficienza di differenziamento rispetto alle cellule coltivate su piastra. A questo scopo abbiamo provato a coltivare le iPSC durante l'ultimo step di differenziamento all'interno dell'organo decellularizzato perfuso in un bio-reattore per 4 giorni. Le cellule sono state ritrovate all'interno della matrice pancreatica e sono attualmente in corso le analisi di caratterizzazione delle cellule mediante immunohistochimica.

Il collaboratore con il Dr. Orlando abbiamo inoltre ottenuto della polvere di pancreas decellularizzato liofilizzato con lo scopo di utilizzarla come supporto al differenziamento delle cellule iPSC in cellule secernenti insulina. Questa matrice verrà confrontata con polveri liofilizzate ottenute da altri tessuti (es. polmone e rene) decellularizzati e non. Questo ci permetterà di investigare il ruolo delle matrici extracellulari tessuto-specifiche nello sviluppo pancreatico.

Fase 3: ricerca di nuove strategie per la selezione delle sole cellule pancreatiche

Abbiamo dimostrato che cellule pancreatiche ottenute dal differenziamento di cellule iPSC, se trapiantate nel modello murino, sopravvivono e producono insulina, ma che altri tipi cellulari contaminano la sede del trapianto, aumentando il rischio oncogenico (Pellegrini et al., 2015).

Alcuni gruppi hanno descritto in questi anni dei marcatori di superficie che dovrebbero consentire di selezionare le cellule pancreatiche derivate dal differenziamento di cellule staminali (Jiang et al., 2011; Kelly et al., 2011), ma essi non sono stati confermati in altri lavori. Recentemente sono state sviluppate delle molecole chiamate SmartFlare™ (Millipore) che consentono di selezionare cellule vive (senza fissazione o permeabilizzazione) in base all'espressione di molecole di mRNA. L'obiettivo di questa parte del progetto è quella provare a selezionare le cellule iPSC durante il differenziamento pancreatico sulla base dell'espressione del mRNA di PDX1, un importantissimo fattore di trascrizione pancreatico. Dati preliminari ottenuti dalla marcatura per PDX1 con Smartflare di cellule iPSC indifferenziate o differenziate a cellule pancreatiche hanno dimostrato che solo le cellule progenitrici pancreatiche sono risultate positive alla marcatura (Figura 7), evidenziando la specificità di questa strategia di selezione.

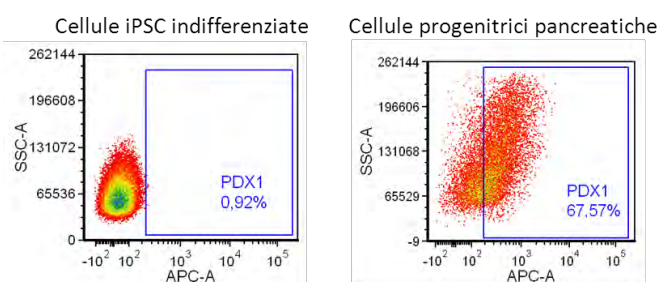


Figura 7. Analisi citofluorimetrica della marcatura con SmartFlare per PDX1 in cellule iPSC indifferenziate o differenziate a cellule progenitrici pancreatiche.

Abbiamo quindi selezionato mediante citometria a flusso le cellule iPSC marcate con SmartFlare-PDX1 durante il differenziamento pancreatico e abbiamo provato a differenziare *in vitro* sia le cellule PDX1+ che quelle PDX1-. A livello di espressione genica, le cellule PDX1+ hanno riportato un'aumentata espressione dei fattori di trascrizione pancreatici MafA, Nkx2.2 e Nkx6.1 (4.3, 4.3 e 418.3 volte rispettivamente) e un incremento di 3.4 volte dell'espressione dell'insulina rispetto alle cellule Pdx1-.

Nei prossimi mesi ci proponiamo di valutare ulteriormente (tramite analisi di espressione genica, immunohistochimica e citofluorimetria) la diversa plasticità delle due popolazioni cellulari selezionate mediante marcatura con SmartFlare-PDX1.

Conclusioni

In conclusione, abbiamo dimostrato che anche cellule iPS riprogrammate con vettori non integranti differenziano *in vitro*, mimando le varie fasi dell'organogenesi pancreatica, in cellule che producono e secernono insulina in risposta al glucosio. Abbiamo inoltre generato matrici derivate da organi decellularizzati liofilizzati che potrebbero apportare significativi miglioramenti all'efficienza di differenziamento di iPSC in beta cellule. La selezione delle cellule Pdx1+ cellule con nanoparticelle SmartFlare sembra una strategia promettente per la selezione di cellule pancreatiche per aumentare la sicurezza e l'efficienza del processo di differenziazione.

Referenze

- Calafiore, R., & Basta, G. (2015). Stem cells for the cell and molecular therapy of type 1 diabetes mellitus (T1D): the gap between dream and reality. *American Journal of Stem Cells*, 4(1), 22–31.
- Chen, S. S., Fitzgerald, W., Zimmerberg, J., Kleinman, H. K., & Margolis, L. (2007). Cell-cell and cell-extracellular matrix interactions regulate embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(3), 553–61. doi:10.1634/stemcells.2006-0419
- Jiang, W., Sui, X., Zhang, D., Liu, M., Ding, M., Shi, Y., & Deng, H. (2011). CD24: a novel surface marker for PDX1-positive pancreatic progenitors derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 29(4), 609–17. doi:10.1002/stem.608
- Kelly, O. G., Chan, M. Y., Martinson, L. a, Kadoya, K., Ostertag, T. M., Ross, K. G., ... Bang, A. G. (2011). Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, (July). doi:10.1038/nbt.1931
- Narayanan, K., Lim, V. Y., Shen, J., Tan, Z. W., Rajendran, D., Luo, S.-C., ... Ying, J. Y. (2014). Extracellular matrix-mediated differentiation of human embryonic stem cells: differentiation to insulin-secreting beta cells. *Tissue Engineering. Part A*, 20(1-2), 424–33. doi:10.1089/ten.TEA.2013.0257
- Pagliuca, F. W., Millman, J. R., Gürtler, M., Segel, M., Van Dervort, A., Ryu, J. H., ... Melton, D. A. (2014). Generation of Functional Human Pancreatic β Cells In Vitro. *Cell*, 159(2), 428–439. doi:10.1016/j.cell.2014.09.040
- Peloso A, Urbani L, Cravedi P, Katari R, Maghsoudlou P, Fallas ME, Sordi V, Citro A... Orlando G. The Human Pancreas as a Source of Protolerogenic Extracellular Matrix Scaffold for a New-generation Bioartificial Endocrine Pancreas. *Ann Surg*. 2016 Jul;264(1):169-79. doi: 10.1097/SLA.0000000000001364.
- Pellegrini, S., Ungaro, F., Mercalli, A., Melzi, R., Sebastiani, G., Dotta, F., ... Sordi, V. (2015). Human induced pluripotent stem cells differentiate into insulin-producing cells able to engraft in vivo. *Acta Diabetologica*. doi:10.1007/s00592-015-0726-z
- Rezania, A., Bruin, J. E., Arora, P., Rubin, A., Batushansky, I., Asadi, A., ... Kieffer, T. J. (2014). Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*. doi:10.1038/nbt.3033
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861–72. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019