



De Potentie van Geïnduceerde Stamcellen

Inmiddels is het begrip ‘stamcellen’ redelijk bekend binnen onze maatschappij. Het gebruik van deze ongespecialiseerde cellen voor onderzoek en potentiële therapieën is in de afgelopen jaren aanzienlijk toegenomen. Een bepaald soort stamcel, de geïnduceerde pluripotente stamcel, kan geproduceerd worden vanuit onze eigen lichaamscellen. Hoe kunnen we deze geïnduceerde stamcellen gebruiken voor diverse soorten onderzoek? En wat betekent dit voor de toekomst van regeneratieve therapeutische behandelingen, ook vanuit een veterinair perspectief?

Soorten stamcellen

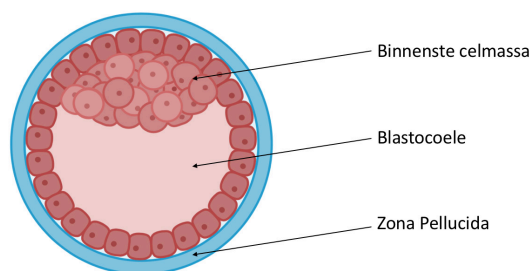
Stamcellen kenmerken zich door hun vermogen zich meermaals te vernieuwen zonder daarbij de capaciteit te verliezen om verschillende celtypes te vormen ^{1,2}. Er zijn verschillende typen stamcellen, waaronder adulte stamcellen. Deze cellen hebben een beperkte differentiatiecapaciteit, namelijk tot één of enkele celtypen ^{1,2}. Denk hierbij aan weefsel-specifieke stamcellen, bijvoorbeeld aanwezig in onze huid, darmen en beenmerg. Stamcellen die het vermogen bezitten om tot elk celtype te kunnen differentiëren, worden pluripotente stamcellen genoemd ^{1,2}. Embryonale stamcellen zijn pluripotent en bevinden zich in de binnenste celmassa van een embryo in het blastocystestadium (Figuur 1). Vervol-

gens zullen embryonale stamcellen differentiëren naar een van de drie kiemlagen en uiteindelijk diverse lichaamscellen vormen.

Naast embryonale stamcellen is er nog een ander type pluripotente stamcellen, welke gegenereerd kunnen worden uit somatische cellen (ofwel: lichaamscellen). Dit worden geïnduceerde pluripotente stamcellen (induced pluripotent stem cells, ofwel iPSCs) genoemd ¹⁻³. De Japanse onderzoekers Yamanaka en Takahashi konden in 2007 voor het eerst iPS cellen genereren uit humane huidcellen ³. Ze ‘reprogrammeerden’ de cellen door introductie van specifieke factoren. Hierdoor konden ze huidfibroblasten terugbrengen naar een pluripotente staat, zoals te zien in Figuur 2. De herprogrammeringsfactoren zorgden voor hogere expressie van genen geassocieerd met pluripotentie, evenals onderdrukking van differentiatie-geassocieerde genen. De geproduceerde iPS cellen waren overeenkomend met humane embryonale stamcellen en konden differentiëren in alle soorten weefsel-specifieke cellen ³.

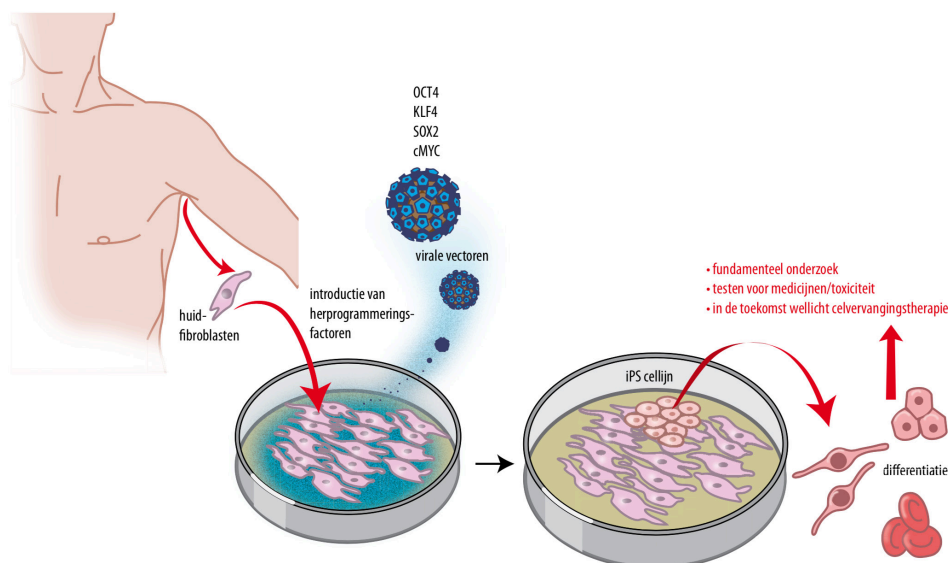
Toepassing van geïnduceerde pluripotente stamcellen: meer dan therapie

Inmiddels is er veel ontwikkeling geweest binnen de iPS-technologie en hebben meerdere instellingen met succes diverse somatische cellen



Figuur 1: Blastocyste met binnenste celmassa

Floor Verdonk, Master Honours Student (Onderzoekstage differentiatie van iPSCs naar notochordale cellen)



Figuur 2:

Herprogrammering van somatische cellen tot geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPS cellen), in dit geval met behulp van een virale vector. Deze iPS cellen kunnen vervolgens gedifferentieerd worden tot weefsel-specifieke cellen en voor verschillende doeleinden worden gebruikt. Bron: Mikkers et al. (2011)

geherprogrammeerd tot iPS-cellen. Na blootstelling aan specifieke reprogrammeringsfactoren kunnen de iPS-cellen gedifferentieerd worden tot diverse weefsel-specifieke cellen (figuur 3).

Hoe kunnen we deze technieken in de praktijk gebruiken? Alom bekend is het mogelijke gebruik van stamcellen voor regeneratieve therapie bij allerlei ziekten^{1,4}. Regeneratieve geneeskunde biedt veel mogelijkheden voor het herstellen en mogelijk vervangen van zieke cellen en weefsels.

Om iPS cellen te kunnen gebruiken voor regeneratieve therapie, moeten de cellen eerst gedifferentieerd worden naar een gespecialiseerde weefsel-specifieke cel. Dit is cruciaal, aangezien het inbrengen van ongedifferentieerde pluripotente stamcellen kan resulteren in teratomen; tumoren die hoog proliferatief zijn en tot veel celtypes kunnen differentiëren⁴. Het voordeel van het therapeutisch gebruik van iPS-cellen ten opzichte van embryonale stamcellen is dat de iPS-cellen uit de patiënt zelf gehaald kunnen worden en zo geen immunoreactie zullen opleveren. Ook zijn er geen ethische limitaties, die bij het gebruik van humane embryo's voor het verkrijgen van de embryonale stamcellen wel van betekenis zijn^{1,2,4}.

Er zijn succesvolle stamcel-gebaseerde studies uitgevoerd die veelbelovend zijn voor de toekomst van regeneratieve geneeskunde^{5,6}. Voor nu is de adulte stamcel nog de gouden standaard in stamcel-gebaseerde therapieën - denk aan de bekende beenmergtransplantaties - maar op het gebied van iPS-cellen worden sprongen gemaakt⁵. Een voorbeeld hiervan is een van de eerste klinische studies met iPS-cellen: Patiënten lijdend aan maculadegeneratie, een degeneratieve oog aandoening van het netvlies, werden bij deze studie behandeld met een transplantatie van patiënt-specifieke iPS cellen, die gedifferentieerd waren naar epitheelcellen van het netvlies⁷. Er waren enorme verbeteringen in het gezichtsvermogen van deze patiënten meetbaar na de behandeling.⁷

De mogelijkheden om beschadigde neuronen te vervangen met iPS-afgeleide neuronale cellen worden volop onderzocht: er loopt nu veel onderzoek op het gebied van neurodegeneratieve aandoeningen, zoals Parkinson's, MS, ALS en rugmergletsels^{5,6}.

Humane iPS cellen kunnen daarnaast ook een belovend therapeutisch vooruitzicht zijn voor een groot scala aan andere vormen van ziekten, zoals oculaire aandoeningen, hartinfarcten en diabetes



mellitus. Zeker in combinatie met CRISPR-cas9*-technologie zijn er veel mogelijkheden; denk bijvoorbeeld aan het terugdraaien van een ziekte-veroorzakende mutatie in de eigen stamcellen van een patiënt, om deze vervolgens weer te differentiëren en te transplanteren als therapie voor beschadigd of ziek weefsel ⁴.

*De CRISPR-cas9 techniek maakt het mogelijk om DNA van cellen zeer gericht te veranderen.

Waarom worden deze therapieën niet al gebruikt?

Er zijn een aantal obstakels die overkomen moeten worden die gepaard gaan met het gebruik van iPS-cellen. Er valt nog veel te winnen op het gebied van

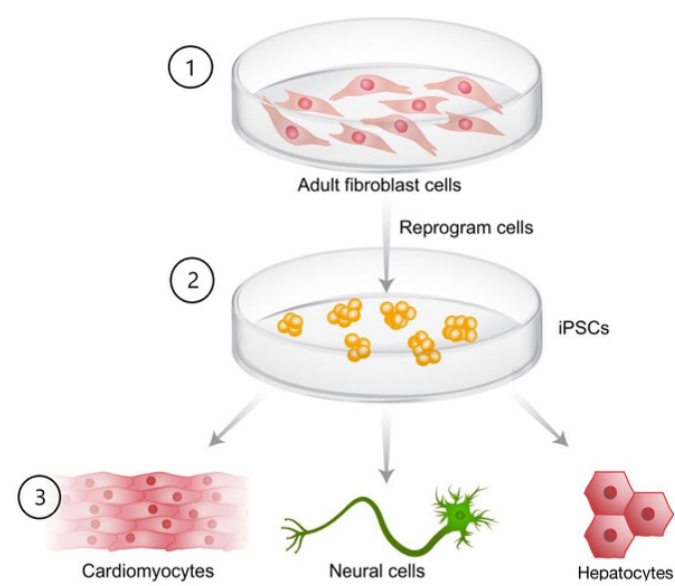
grammeringsfactoren, zijn veiliger maar een stuk minder efficiënt ⁴.

De veiligheid van de herprogrammering vormt geen obstakel als de iPS cellen voor andere doeleinden worden gebruikt naast therapie. Stamcellen kunnen namelijk zeer goed gebruikt worden om celsystemen te creëren en op deze manier meer inzicht te verkrijgen in toxicologie, pathogenese van ziekten en effect van mogelijke gen- en medicijntherapieën in experimenten (Figuur 4) ¹⁻⁶.

Voor veel (chronische) ziektes zijn er geen medicijnen beschikbaar, werken huidige medicijnen niet goed, of worden veel negatieve bijwerkingen gezien. Door deze medicijnen eerst te testen op celsystemen gegenereerd met behulp van iPS-cellen, zullen behandelingen effectiever worden en minder bijwerkingen hebben. De ontwikkeling van medicijnen kan daardoor sneller en goedkoper zijn. Daarbovenop is het een goed alternatief voor dierproeven ⁵.

Het is voordelig om iPS-cellen te gebruiken voor degelijk onderzoek, in plaats van reguliere embryonale cellijnen, omdat er gebruik kan worden gemaakt van patiënt-specifieke cellen. Veelal is een genetische afwijking die een ziekte kan veroorzaken niet aanwezig in embryonale cellijnen. Ook is generatie van iPS-cellen uit lichaamscellen van een patiënt met deze genetische afwijking mogelijk, zodat deze gebruikt kunnen worden voor verder onderzoek. De CRISPR/Cas9 techniek kan ook gebruikt worden voor onderzoek: door genetische mutaties te corrigeren of induceren, kunnen genetische aandoeningen bestudeerd worden ⁴.

Bij een onderzoek uit 2010 werden cardiomyocyten (hartcellen) gegenereerd uit iPS cellen ⁸. Fibroblasten werden gebruikt afkomstig van patiënten met het lange QT-syndroom, een hartritmestoornis



Figuur 3: Geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPS-cellen) kunnen geproduceerd worden vanuit huidfibroblasten. Vervolgens kunnen deze iPS-cellen gedifferentieerd worden tot diverse lichaamscellen. Bron: Scarfone, R.A. et al (2020)

specifieke differentiatie in verschillende subpopulaties cellen en het correct matureren van cellen, zonder kans op tumorvorming door het hoog proliferatief vermogen van de stamcellen ^{5,6}. Ook de overleving van de vanuit-iPS-gedifferentieerde cellen en het juist integreren van de cel transplantaties in het lichaam blijven een struikelblok ⁴⁻⁶. Verder verschillen de diverse methodes van herprogrammering van lichaamscellen in efficiëntie en veiligheid. Herprogrammering via een virale vector, zoals bij het experiment van Yamanaka en Takahashi, is heel efficiënt, maar minder veilig door mutagenese en aanwezigheid van virale componenten ^{3,4}. Andere technieken zoals transfectie, een methode om cellen tijdelijk permeabel te maken voor mRNA dat codeert voor repro-



veroorzaakt door een genmutatie. De fibroblasten werden geïnduceerd tot patiënt-specifieke iPS-cellen. Er werd gezien dat de iPS cellen hun pathologische genotype behielden en functionele cardiomyocyten genereerden. Deze cardiomyocyten lieten elektrofysiologische kenmerken zien die kenmerkend waren voor het syndroom (zie figuur 5). De pathogenese van de mutatie kan dus gegenereerd worden in pluripotente stamcellijnen afkomstig van patiënten met het syndroom. Dit is voordelig, omdat medicijnen getest kunnen worden in vitro met het gebruik van deze patiënt-specifieke cellen ⁸. Een ander voorbeeld: hepatocyten, afkomstig van iPS-cellen met verschillende genetische achtergronden en ziektegeschiedenis, kunnen gebruikt worden voor het voorspellen van lever toxiciteit van diverse mogelijke medicijnen ³.

Toepassingen bij dieren

Onderzoek naar iPS-cellen is voornamelijk gericht op de mens, maar de laatste jaren is er ook veel onderzoek bijgekomen gericht op onze gedomesticeerde dieren. Protocollen voor het ontwikkelen van iPS-cellen vanuit lichaamscellen bestaan voor onder andere varkens, paarden, honden, katten, koeien, geiten & schapen ⁹. In vitro differentiatie van deze iPS-cellen geeft de mogelijkheid om verschillende ziekteprocessen te bestuderen en kan het pre-klinisch testen van therapeutische medicijnen uitvoerbaar maken in het humane en veterinaire veld. Bij verschillende diersoorten zijn degelijke onderzoeken verricht.

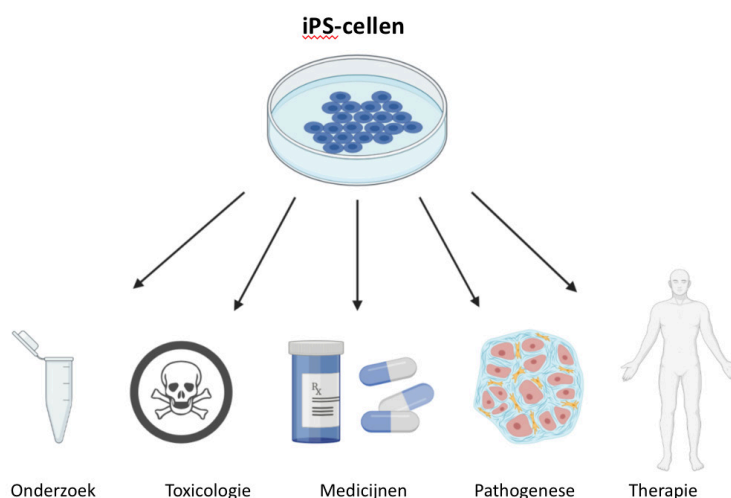
Bij een onderzoek uit 2018 werden equine iPS-afgeleide zenuwcellen succesvol geïnfecteerd met het Westnijlvirus en het Murray Valley-virus ¹⁰. Dit kan waardevol zijn voor verder onderzoek naar de mechanismen van deze infectieuze zoönosen.

Wat betreft het therapeutisch aspect bij het paard, zouden beschadigde musculoskeletale weefsels zoals botten, pezen en spieren profiteren

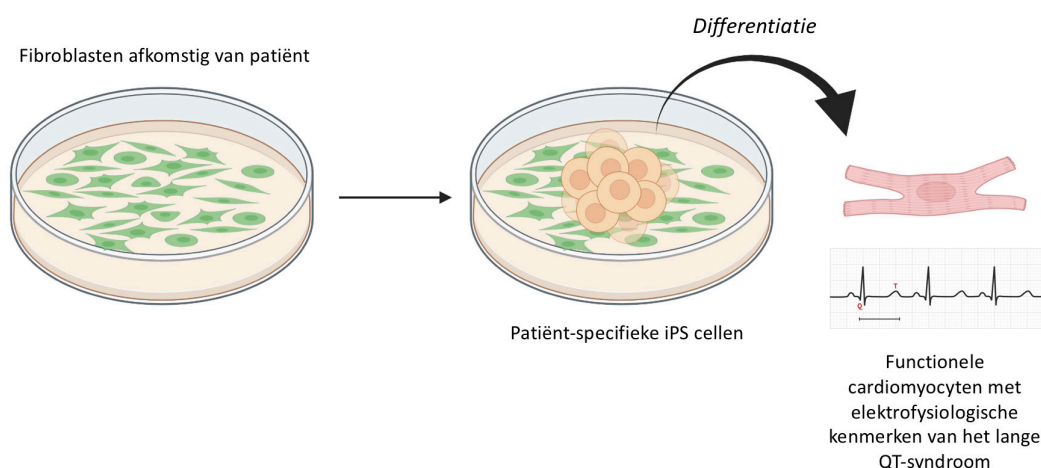
van potentiële iPS-gerelateerde oplossingen. Bij een experiment uit 2019 werden equine iPS-cellen gedifferentieerd tot mesenchymale stamcellen. Deze werden vervolgens geïnjecteerd voor de behandeling voor diverse orthopedische aandoeningen, zoals breuken, tendonitis, osteochondrose en osteoartritis ¹¹. Verbeteringen ten opzichte van de reguliere behandeling werden geobserveerd, waaronder verminderde koorts en fractuurlijnen.

Bij honden wordt er gekeken naar manieren om iPS-afgeleide chondrocyten en osteoblasten te gebruiken voor het modelleren van het osteoarthritis ziekteproces ⁹. Verder bestaat er een protocol voor het produceren van functionele bloedplaatjes vanuit iPS cellen afkomstig van honden. Dit zou potentieel gebruikt kunnen worden als behandeling voor trombocytopenie bij honden, waar nu als enige behandeling bloedtransfusie beschikbaar is ¹².

iPS-cellen afkomstig van varkens zijn in diverse celtypes gedifferentieerd voor onderzoeksdoeleinden, onder andere in neurale progenitor cellen, endotheelcellen en hepatocyten ⁹. Desondanks de ontwikkelde protocollen, is het gebruik van stamcellen



Figuur 4: De verschillende toepassingen van iPS-cellen



Figuur 5: Generatie van patiënt-specifieke iPS-cellen vanuit fibroblasten van patiënten met het QT syndroom. Deze iPS cellen worden gedifferentieerd naar functionele cardiomyocyten met elektrofysiologische eigenschappen kenmerkend voor het lange QT-syndroom.

voor onderzoek gericht op de ziekten van onze landbouwhuisdieren gelimiteerd. In de toekomst zou dit onderzoek nuttig kunnen zijn voor het bestuderen van fysiologie, pathologie en vaccinontwikkeling binnen de veesector ⁹.

Obstakels binnen iPS-gebaseerde therapieën zijn overeenkomstig met de humane geneeskunde: immuunreactiviteit kan een probleem vormen, er is kans op tumorvorming door het proliferatieve potentieel van de cellen en daarbovenop komen de hogere kosten van dergelijke behandelingen ^{9b}.

Conclusie & Toekomstperspectief

Geïnduceerde pluripotente stamcellen zijn een veelbelovend instrument op het gebied van onderzoek en voor mogelijke regeneratieve therapieën binnen het humane én veterinaire veld. Er zijn al verschillende protocollen ontwikkeld voor het ontwikkelen van iPS-cellen en deze cellen worden al ingezet voor onderzoek naar ziekteprocessen, toxicologie en genetische defecten. Het is belangrijk voor het slagen van de iPS-technologie dat instellingen vergelijkbare procedures

en technieken gebruiken; het standaardiseren van protocollen is nodig. Er zijn nog obstakels te overkomen voordat we iPS-cellen therapeutisch kunnen toepassen. Het reprogrammeren van de cellen moet via een veilige weg gebeuren zodat deze cellen in vivo toegepast kunnen worden. Ook moeten immuunreactiviteit en tumorvorming geen gevaren meer kunnen vormen.

Desondanks brengt de iPS-technologie veel interessante mogelijkheden met zich mee. Inzicht in de pathologie van diverse hart-en-vaatziekten zal onze kennis verrijken. Medicijnen voor longpatiënten zouden specifiek getest kunnen worden op hun persoonlijke 'long-op-een-chip', geproduceerd uit iPS-cellen. Behandelingen voor ernstige neurodegeneratieve aandoeningen, zoals Parkinson, kunnen mooie vooruitzichten zijn.

Referenties

1. Mikkers, H.M.M., Hoeben, R.C (2011). Stamcellen: therapeutische toepassingen en experimentele technieken. Nederlands tijdschrift geneeskunde, 155:A3565.
2. Ohnuki, M., & Takahashi,



- K. (2015). Present and future challenges of induced pluripotent stem cells. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 370(1680), 20140367.
3. 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), 861–872.
4. Moradi, S., Mahdizadeh, H., Sari, T. et al. (2019). Research and therapy with induced pluripotent stem cells (iPSCs): social, legal, and ethical considerations. *Stem Cell Res Ther*, 10, 341.
5. Aly R. M. (2020). Current state of stem cell-based therapies: an overview. *Stem cell investigation*, 7, 8.
6. Martin U. (2017). Therapeutic Application of Pluripotent Stem Cells: Challenges and Risks. *Frontiers in medicine*, 4, 229.
7. Mandai, M., Kurimoto, Y., & Takahashi, M. (2017). Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *The New England journal of medicine*, 377(8), 792–793. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1706274>
8. Moretti, A., Bellin, M., Wellington, A., Jung, C. B., Lam, J. T., Bott-Flügel, L., Dorn, T., Goedel, A., Höhnke, C., Hofmann, F., Seyfarth, M., Sinnecker, D., Schömig, A., & Laugwitz, K. L. (2010). Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *The New England journal of medicine*, 363(15), 1397–1409.
9. Scarfone, R.A., Pena, S.M., Russell, K.A. et al. The use of induced pluripotent stem cells in domestic animals: a narrative review. *BMC Vet Res* 16, 477 (2020).
10. Fortuna PRJ, Bielefeldt-Ohmann H, Ovchinnikov DA, Wolvetang EJ, Whitworth DJ. Cortical neurons derived from equine induced pluripotent stem cells are susceptible to neurotropic flavivirus infection and replication: an in vitro model for equine neurodegenerative diseases. *Stem Cells Dev*. 2018;27(10):704–15.
11. Chung M-J, Park S, Son J-Y, Lee J-Y, Yun HH, Lee E-J, et al. Differentiation of equine induced pluripotent stem cells into mesenchymal lineage for therapeutic use. *Cell Cycle*. 2019;18(21):2954–71.
12. Nishimura T, Hatoya S, Kanegi R, Sugiura K, Wijewardana V, Kuwamura M, et al. Generation of functional platelets from canine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*. 2013;22(14):2026–35.