



Samenvatting proefschrift S.F.J. de Witte

“Probing the immunomodulatory potential of Mesenchymal stromal cells”

**Promotie: 20 november 2018
Erasmus Universitair Rotterdam**

Promotor:
Prof. Dr. C.C. Baan

Copromotor:
Dr. M.J. Hoogduijn

De behandeling van patiënten met een immunologische aandoening of patiënten die een orgaantransplantatie hebben ondergaan bestaat uit langdurig gebruik van immunosuppressieve medicijnen. Deze medicijnen hebben naast hun therapeutische werking ook veel bijwerkingen. Hierdoor is er behoefte aan een nieuwe behandelingsmogelijkheid met minder of, idealiter, geen bijwerkingen. Het gebruik van mesenchymale stam of stromale cellen (MSC) biedt hierbij uitkomst. Het gebruik van deze cellen als celtherapie is veelbelovend door de verscheidene eigenschappen die deze cellen bezitten om het immuun systeem te reguleren. Het doel van dit proefschrift was om de immuunmodulerende functie van MSC te optimaliseren en daarnaast ook hun werkingsmechanisme uit te zoeken.

MSC bevinden zich door het lichaam heen en hebben de mogelijkheid om zich te kunnen differentiëren in onder andere bot, kraakbeen of vet. Naast de potentie zich te kunnen differentiëren in verschillende celtypes, bezitten MSC ook de capaciteit om te communiceren met de cellen van het immuun systeem. Oftewel MSC hebben immuunmodulerende eigenschappen. Verscheidene studies hebben al getracht de immuunmodulerende eigenschappen van MSC te activeren om zo tot betere therapeutische uitkomsten te komen. In hoofdstuk twee van dit proefschrift is een overzicht gepresenteerd van de huidige kennis met betrekking tot de immuunmodulerende eigenschappen van MSC en hoe deze geactiveerd kunnen worden.

Voordat MSC gekweekt en/of bewerkt kunnen worden in het laboratorium moeten ze eerst uit het weefsel geïsoleerd worden. Ondanks het feit dat dat isolatie uit weefsel makkelijk is, is hun opbrengst laag. MSC worden daarom na isolatie een tijd gekweekt in het laboratorium om zo aan klinisch relevante aantallen te komen. Hoewel dit een noodzakelijk fenomeen is, brengt dit risico's met zich mee. MSC kunnen namelijk tijdens het kweken veranderingen ondergaan. Deze kunnen nadelige gevolgen hebben voor de veiligheid en effectiviteit van de therapie. In hoofdstuk drie is het effect van



langdurige kweek op het fenotype en de functionaliteit van MSC onderzocht. Er is aangetoond dat MSC minder goed zijn in het onderdrukken van T-cel proliferatie na langdurige kweek, terwijl hun immuunfenotype, genetische stabiliteit en hun gevoeligheid voor NK cel cytotoxiciteit wel wordt stabiel blijft. Dit betekent dat wanneer inhibitie van de T-cel proliferatie van MSC wordt verwacht de voorkeur zal gaan naar het gebruik van MSC uit korte kweken.

MSC kunnen direct na het kweken gebruikt worden of ze kunnen worden ingevroren (ook wel cryopreservatie genoemd). Cryopreservatie en de daarop volgende ontdooiing kunnen de eigenschappen van MSC ook beïnvloeden. Hoofdstuk vier laat zien dat MSC direct uit kweek (vers) en MSC welke ontdooid zijn na cryopreservatie weinig verschillen van elkaar en eenzelfde reactie initiëren in de longen na toediening. Dit laat zien dat zowel verse MSC als gecryopreserveerde MSC gebruikt kunnen worden voor therapeutische doeleinden.

Wanneer MSC via intraveneuze route worden toegediend lopen ze, vanwege hun grootte, vast in het microvasculatuur van de longen. Hier initiëren ze een inflammatoire reactie welke een bekend onderdeel is van hun werkingsmechanisme. Maar heeft het microvasculatuur van de longen invloed op de MSC? Dit is ook onderzocht in hoofdstuk vier. Hier werd vervolgens inderdaad aangetoond dat MSC door het long microvasculatuur beïnvloed worden.

In hoofdstuk vijf werden MSC in het laboratorium behandeld met verschillende cytokines, groeifactoren en kweekomstandigheden met als doel om de therapeutische eigenschappen van MSC te activeren en te optimaliseren. Aangetoond werd dat het mogelijk is om MSC te modificeren door stimulatie: IFN γ , TGF β en een multifactor combinatie (MC: IFN γ , TGF β en RA) stimulatie resulteerde in de meest veelbelovende veranderingen met betrekking tot hun immuunmodulerende eigenschappen en gevoeligheid voor NK cel cytotoxiciteit. Bovendien waren MSC gestimuleerd met MC ook beter in het verhelpen van lever inflammatie in een model waar dunne leverplakjes werden gebruikt, in vergelijking met ongestimuleerde MSC. De kennis dat MSC gemodificeerd kunnen worden kan vervolgens benut worden om op maat gemaakte immuuntherapie met MSC te genereren in de toekomst.

Voor de verdere ontwikkeling van MSC in een effectief cellulair immuuntherapie is het belangrijk om een volledig beeld te krijgen omtrent de veranderingen die MSC ondergaan na stimulatie met IFN γ , TGF β en MC of gedurende het kweken. Door te kijken naar de epigenetische veranderingen, zoals DNA methylatie, kan er een meer gedetailleerd beeld gecreëerd worden van het therapeutische product. In hoofdstuk zes werd aangetoond dat MSC vrijwel geen DNA methylatie veranderingen ondergaan na stimulatie met IFN γ , TGF β en MC. Daarentegen zorgde het kweken van MSC wel voor grote veranderingen in hun DNA methylatie profiel. De impact van deze epigenetische veranderingen is nog grotendeels onbekend, maar ze kunnen gevolgen hebben voor de veiligheid en functionaliteit. Het beoordelen en valideren van het epigenoom van therapeutische MSC ten opzichte van een vastgestelde standaard naast de huidige kwaliteitscontroles word vanwege deze resultaten daarom aangeraden.



Het werkingsmechanisme van intraveneus toegediende MSC is in hoofdstuk zeven onderzocht. Monocyten werden hier aangewezen als de belangrijkste schakel in het werkingsmechanisme van MSC. Aangetoond werd dat intraveneus toegediende MSC gefagocyteerd worden door monocyten, nadat ze vast komen te zitten in de longen. Deze monocyten nemen vervolgens een meer regulatoire fenotype aan. Waarna ze zich door het hele lichaam verplaatsen, via de bloedbaan. Ook is er aangetoond dat deze monocyten de productie van Foxp3+ regulatoire T cellen in vitro (in een kweekbakje) aanzet. Dit is gunstig, omdat deze cellen een rol spelen in tolerantie en directe interacties aangaan met cellen van het immuun systeem. Deze resultaten samen laten dus eigenlijk zien dat MSC alleen een snelle trigger zijn voor monocyten waarna hun immuunmodulerende functie door monocyten wordt voortgezet.

Hoofdstuk acht laat vervolgens zien dat het immuunmodulatoire werkingsmechanisme van MSC niet afhangt van actieve interacties met immuuncellen, maar juist aan de herkenning van MSC door immuuncellen, zoals monocyten. Het is dus de buitenkant van MSC en vervolgens hun herkenning door monocyten van de ontvanger dat van groot belang is voor het therapeutische effect van MSC.

Vervolgens werd in hoofdstuk negen naar de herkenning en respons van monocyten op MSC, welke geïnactiveerd (MSC met intacte buitenkant, maar niet instaat om actieve interacties aan te gaan) of gestimuleerd waren met IFN γ , TGF β , RA of MC, gekeken. Het fagocyterende gedrag van monocyten en hun hierop volgende fenotype switch werd beïnvloed door het stimuleren van MSC met IFN γ , TGF β , RA of MC. Inactivatie van MSC beïnvloedde ook de response van monocyten, maar in grotere mate, waarbij monocyten verder switchten naar een meer regulerend fenotype dan bij controle MSC. Dit laat zien dat naast passieve interacties er waarschijnlijk ook nog invloed is van het secretoom van MSC of dat er ook nog actieve interacties tussen monocyten en MSC plaatsvinden.

Samenvattend, het onderzoek beschreven in dit proefschrift onthult de cruciale rol van monocyten in het immuunmodulerende werkingsmechanisme van MSC, waarin MSC zelf voornamelijk een snelle trigger zijn. Verder zijn de responsen van MSC op zowel verschillende stimulaties als gedurende de kweek in kaart gebracht in dit proefschrift. Het onderzoek toont vervolgens aan dat modificatie van MSC door middel van stimulatie, met als doel hun therapeutische eigenschappen te optimaliseren, mogelijk is. Alles samengenomen, is deze nieuw vergaarde kennis omtrent het werkingsmechanisme en modificatie mogelijkheden van MSC van belang voor de verdere ontwikkeling van effectieve immuuntherapie met MSC.