

Het verbeteren van klinische uitkomsten na stamceltransplantatie met navelstrengbloed door het vermeerderen van hematologische stam- en voorlopercellen

Improving umbilical cord blood stem cell engraftment by ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells

dr. L.E. Duinhouwer

SAMENVATTING

Op 15 november 2016 promoveerde Lucia E. Duinhouwer aan de Erasmus Universiteit Rotterdam op haar promotieonderzoek, getiteld 'Het verbeteren van klinische uitkomsten na stamceltransplantatie met navelstrengbloed door het vermeerderen van hematologische stam- en voorlopercellen', onder begeleiding van promotor prof. dr. J.J. Cornelissen en copromotor dr. E. Braakman. Hieronder zijn de belangrijkste bevindingen uit haar proefschrift weergegeven.

(NED TIJDSCHR HEMATOL 2017;14:209-11)

SUMMARY

On the 15th of November, 2016, Lucia E. Duinhouwer defended her thesis, entitled 'Improving umbilical cord blood stem cell engraftment by ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells' at the Erasmus University Rotterdam under supervision of promotor prof. J.J. Cornelissen, MD, PhD, and copromotor E. Braakman, PhD. The most important findings described in her thesis are summarized in this report.

INLEIDING

De eerste allogene hematopoëtische stamceltransplantatie (allo-SCT) waarbij gebruik werd gemaakt van navelstrengbloed werd in 1988 uitgevoerd bij een patiënt met fanconi-anemie.¹ De afgelopen decennia heeft navelstrengbloed zich ontwikkeld tot een belangrijke alternatieve stamcelbron voor patiënten die een allo-SCT nodig hebben, maar voor wie geen passende (HLA-gematchte) verwante of niet-verwante donor beschikbaar is. Momenteel (2016) zijn er wereldwijd al meer dan 35.000 navelstrengbloedtransplantaties ('umbilical cord blood transplantations'; UCBT) uitgevoerd.² Voordelen

van navelstrengbloed zijn de snelle beschikbaarheid van het ingevroren transplantaat en de minder strenge criteria voor HLA-matching tussen navelstrengbloed en patiënt. Er zijn echter ook nadelen verbonden aan transplantatie met navelstrengbloed ten opzichte van transplantatie met andere stamcelbronnen. Nadelen zijn een verhoogd risico op vertraagd hematopoëtisch herstel en een hogere incidentie van 'graft failure', wat resulteert in een hoger risico op 'non-relapse mortality'.³ Het vertraagde hematopoëtische herstel en hogere risico op 'graft failure' is geassocieerd met het aantal hematopoëtische stamcellen (HSC) in het navelstrengbloed-

Correspondentie graag richten aan mw. dr. L.E. Duinhouwer, afdeling Hematologie, Erasmus MC, Wytemaweg 80, 3015 CN Rotterdam, tel.: 06 18 34 36 56, e-mailadres: l.duinhouwer@erasmusmc.nl

Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: het onderzoek beschreven in dit proefschrift is gefinancierd door een subsidie van TIPharma en werd uitgevoerd binnen TIPharma project D5-402 'The Prograft Study: optimizing the applicability of stem cell therapy'.

Trefwoorden: allogene stamceltransplantatie, navelstrengbloed, hematopoëtische stamcellen, stamcelexpansie

Keywords: allogeneic stem cell transplantation, hematopoietic stem cell, stem cell expansion, umbilical cord blood

transplantaat.⁴ In de huidige richtlijnen wordt het gebruik van transplantaten met een laag aantal kernhoudende cellen (als maat voor het aantal HSC) afgeraden, waardoor een groot deel van de opgeslagen navelstrengbloedtransplantaten niet geschikt is voor klinisch gebruik bij volwassen patiënten. Om het aantal HSC in het transplantaat te verhogen en daarmee de klinische uitkomsten van navelstrengbloedtransplantatie te verbeteren, werd de ‘dubbele UCBT’ (dUCBT) ontwikkeld, waarbij twee navelstrengbloedtransplantaten aan één patiënt worden gegeven. Hoewel dUCBT leidt tot een afname van het aantal ‘graft failures’, blijft het hematopoëtische herstel vertraagd. Na dUCBT treedt meestal dominantie op van één van beide eenheden navelstrengbloed. Het hematopoëtische herstel is afkomstig van één navelstrengbloedeenheden, terwijl het andere transplantaat wordt afgestoten door allo-reactieve T-cellen afkomstig van de winnende navelstrengbloedeenheden.⁵ Een andere strategie om het aantal HSC in het navelstrengbloedtransplantaat te vermeerderen, is ex-vivo-expansie. In eerste instantie werden expansieprotocollen ontwikkeld met verschillende cocktails van hematopoëtische groeifactoren die zorgden voor proliferatie en overleving, maar ook uitrijping van de stamcellen. Dit resulteerde in de productie van grote aantallen uitgerijpte voorlopercellen, terwijl de stamcellen niet meer aanwezig waren.⁶ In dit proefschrift is de hypothese onderzocht dat HSC ex vivo kunnen worden geëxpandeerd door hematopoëtische groeifactoren te combineren met een factor die de differentiatie remt.

EXPANSIE VAN HSC MET GROEIFACTOREN EN HET EIWIJ WINGLESS-INT3A (WNT3A)

Wingless int (Wnt)-eiwitten spelen een belangrijke rol in de regulatie van de proliferatie en differentiatie van diverse typen stamcellen, waaronder embryonale en epitheliale stamcellen. De combinatie van tyrosinekinase activerende groeifactoren en Wnt3a had in eerder onderzoek geleid tot de ex-vivo-expansie van embryonale stamcellen (ES-cellen), waarbij het effect van Wnt beruiste op remming van differentiatie van ES-cellen.⁷ Wij onderzochten de hypothese dat de combinatie van hematopoëtische groeifactoren en Wnt3a een vergelijkbaar effect zou hebben op de ex-vivo-expansie van HSC. Een serumvrij kweekprotocol met daarin een combinatie van de hematopoëtische groeifactoren ‘stem cell factor’ (SCF), ‘FMS-like tyrosine kinase 3 ligand’ (Flt3L) en ‘thrombopoietin’ (TPO), verder SFT genoemd, en het eiwit Wnt3a werd ontwikkeld. Om de hypothese te toetsen werden hematopoëtische stam- en voorloper-

cellen (HSPC), geïsoleerd uit zowel muizenbeenmerg (LSK-cellen) als uit humaan navelstrengbloed (CD34⁺-cellen), gekweekt in aan- en afwezigheid van Wnt3a. In tegenstelling tot de hypothese, werd echter geen toename in expansie van het aantal LSK- of CD34⁺-cellen gezien na toevoeging van Wnt3a aan het kweekstelsel, maar juist een afname. Hetzelfde effect werd met Lin⁻CD34⁺CD38^{low}CD45RA⁻CD90⁺-cellen uit navelstrengbloed gezien, die in hoge mate verrijkt zijn voor HSC. Aanvullende experimenten toonden aan dat het waargenomen effect daadwerkelijk te wijten was aan activering van de Wnt-signaalroute en dat stabilisering van het Wnt3a-eiwit in liposomen (liposomaal Wnt3a) niet leidde tot verbeterde expansie. De combinatie van groeifactoren en Wnt3a leidde niet tot remming van de differentiatie door Wnt3a, maar leek mogelijk zelfs te leiden tot meer differentiatie.

EXPANSIE VAN HSC MET GROEIFACTOREN EN ‘ARYL HYDROCARBON RECEPTOR’ (AHR)-ANTAGONIST ‘STEMREGENIN1’ (SR1)

Een andere potentiële factor voor het remmen van differentiatie van HSC is de AhR-antagonist StemRegenin1 (SR1). Eerdere studies suggereerden dat de combinatie van groeifactoren met SR1 wel zou kunnen leiden tot stamcelexpansie.⁸ In het door ons ontwikkelde kweekstelsel werd SR1 in serumvrij kweekmedium gecombineerd met de SFT-groeifactorcocktail. Deze combinatie resulteerde na 10 dagen in meer dan 25 keer expansie van Lin⁻CD34⁺CD38^{low}CD45RA⁻CD90⁺-cellen, de populatie hematopoëtische voorlopercellen die het meest verrijkt is voor HSC. Deze geëxpandeerde cellen behielden hun stamceleigenschappen zoals getest in functionele in-vitro-assays (LTC-IC-assays) en door middel van transplantatie bij immuundeficiënte NSG-muizen. Transplantatie van SR1-geëxpandeerde HSPC leidde tot langetermijnherstel van rijpe humane cellen in het perifere bloed van NSG-muizen.

Het onderzoeksprotocol voor expansie van HSC uit navelstrengbloed met groeifactoren en SR1 is omgezet in een expansieprotocol conform ‘Good Manufacturing Practice’ (GMP)-normen, dat kan worden gebruikt voor de expansie van HSC en HPC uit transplantaten. In een recente studie lieten Wagner et al. zien dat transplantatie van SR1-geëxpandeerde cellen in een dUCBT-setting veilig kan worden uitgevoerd met hematopoëtisch herstel bij alle 17 behandelde patiënten.⁹ Bij 11 van de 17 patiënten was de hematopoëse na transplantatie afkomstig van het SR1-geëxpandeerde transplantaat. Deze patiënten lieten een sneller hematologisch

herstel zien dan patiënten bij wie het onbehandelde transplantaat engraftte (11 versus 23 dagen voor neutrofiel herstel, respectievelijk). Deze resultaten hebben de weg geplaveid voor een klinische studie in een enkele UCBT-setting. Op korte termijn zal in het Erasmus MC een prospectieve fase 1/2-studie starten, waarin 10 patiënten met acute leukemie, die in aanmerking komen voor een navelstrengbloedtransplantatie, zullen worden behandeld met een SR1-geëxpandeerd navelstrengbloedtransplantaat. Patiënten zullen worden geconditioneerd door middel van een 'reduced-intensity conditioning'-regime. Post-transplantatie immuunsuppressie bestaat uit mycofenolaat mofetil (30 dagen) en cyclosporine A (90 dagen, waarna afbouwen).

CONCLUSIE

De combinatie van de hematopoëtische groeifactoren SCF, Flt3L en TPO met de AhR-antagonist SR1 leidt tot adequate expansie van HSC en HPC uit navelstrengbloed. Daarentegen lijkt het eiwit Wnt3a juist een differentiatie-inducerende werking te hebben op HSC in het door ons ontworpen kweekstelsel. De resultaten beschreven in dit proefschrift hebben geleid tot de ontwikkeling van een klinisch protocol waarvan het doel is om de veiligheid van transplantatie van SR1-geëxpandeerde van stam- en voorlopercellen afkomstig van één navelstrengbloedeenheden te evalueren. In deze fase 1/2-studie, die op korte termijn zal starten, zullen 10 patiënten worden geïncubeerd.

REFERENTIES

1. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321(17):1174-8.
2. Ballen KK, Verter F, Kurtzberg J. Umbilical cord blood donation: public or private? *Bone Marrow Transplant* 2015;50(10):1271-8.
3. Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet* 2007;369(9577):1947-54.
4. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002;100(5):1611-8.
5. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, et al. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 2005;105(3):1343-7.
6. Sauvageau G, Iscove NN, Humphries RK. In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Oncogene* 2004;23(43):7223-32.
7. Ten Berge D, Kurek D, Blauwkamp T, et al. Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. *Nat Cell Biol* 2011; 13(9):1070-5.
8. Boitano AE, Wang J, Romeo R, et al. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science* 2010; 329(5997):1345-8.
9. Wagner JE Jr, Brunstein CG, Boitano AE, et al. Phase I/II trial of stemregenin-1 expanded umbilical cord blood hematopoietic stem cells supports testing as a stand-alone graft. *Cell Stem Cell* 2016;18(1):144-55.

ONTVANGEN 17 JANUARI 2017, GEACCEPTEERD 5 APRIL 2017.