

# Meer dan een decennium geïnduceerde pluripotente stamcellen: een overzicht

More than a decade of induced pluripotent stem cell research: an overview

M. Hansen<sup>1</sup>, dr. E. van den Akker<sup>1</sup>

## SAMENVATTING

Dit jaar, 2019, markeert het dertiende jaar sinds de baanbrekende publicatie door Kazutoshi Takahashi en Shinya Yamanaka waarin ze de herprogrammering van fibroblasten tot geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC) beschreven door middel van de inmiddels bekende transcriptiefactoren OCT3/4, SOX2, c-MYC en KLF4. Hiervoor heeft Shinya Yamanaka samen met John Gurdon, voor eerder baanbrekend werk, in 2012 de Nobelprijs voor Geneeskunde ontvangen. Deze doorbraak heeft tot een volledig nieuw onderzoeksveld binnen de regeneratieve en cellulaire productontwikkeling geleid. Het feit dat deze iPSC intrinsiek kunnen differentiëren tot elke gewenste somatische cel heeft immers, behalve onschatbare waarde binnen de fundamentele wetenschap, enorme klinische potentie. In de laatste twaalf jaar is het aantal iPSC-onderzoeksgroepen dus ook sterk gegroeid met als ultieme doel: toepassing van iPSC-producten in de kliniek. Dit decennium heeft onder andere in het teken gestaan van het verfijnen van de herprogrammeringstechnieken, includeren van 'good manufacturing practice'-protocollen (GMP), optimalisatie van iPSC-kweken en differentiatieprotocollen, en het optimaliseren van genetischemanipulatietechnieken. In dit overzichtsartikel geven we naast een historisch overzicht ook de laatste ontwikkeling op het iPSC-vlak, met de nadruk op uitrijping tot bloedvormende cellen.

(NED TIJDSCHR HEMATOL 2019;16:30-8)

## SUMMARY

2019 marks the thirteenth year since the groundbreaking publication by Kazutoshi Takahashi and Shinya Yamanaka describing the reprogramming of fibroblasts to induced pluripotent stem cells (iPSC) by introducing the now well-known transcription factors OCT3/4, SOX2, c-MYC and KLF4. For this, Shinya Yamanaka, together with John Gurdon for earlier pioneering work, received the Nobel Prize in Medicine. This breakthrough has led to a completely new research field within the regenerative and cellular product development. The fact that these iPSC can intrinsically differentiate into any desired somatic cell has, besides inestimable value within fundamental science, enormous clinical potential. In the last twelve years, the number of iPSC research groups has also grown strongly with the ultimate goal: application of iPSC products in the clinic. This decade has been marked by refining reprogramming techniques, including good manufacturing practice protocols (GMP), optimization of iPSC expansion and differentiation protocols, and the optimization of genetic manipulation techniques. In this overview article, in addition to a historical overview, we also provide the latest development on the iPSC level, with the emphasis on maturation to blood-forming cells.

<sup>1</sup>Sanquin Research, afdeling Hematopoëse, en Landsteiner Laboratorium, Amsterdam UMC, locatie Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam.

Correspondentie graag richten aan dhr. dr. E. van den Akker, Sanquin Research, afdeling Hematopoëse, Plesmanlaan 125, 1066 CX Amsterdam, tel.: 06 31 01 04 73, e-mailadres: e.vandenakker@sanquin.nl

Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: dit werk is mogelijk gemaakt door financiële ondersteuning van Sanquin aan EvdA en MH (PPOC: 15-2089).

**Trefwoorden:** geïnduceerde pluripotente stamcel, hematopoëse, iPSC, reprogrammering

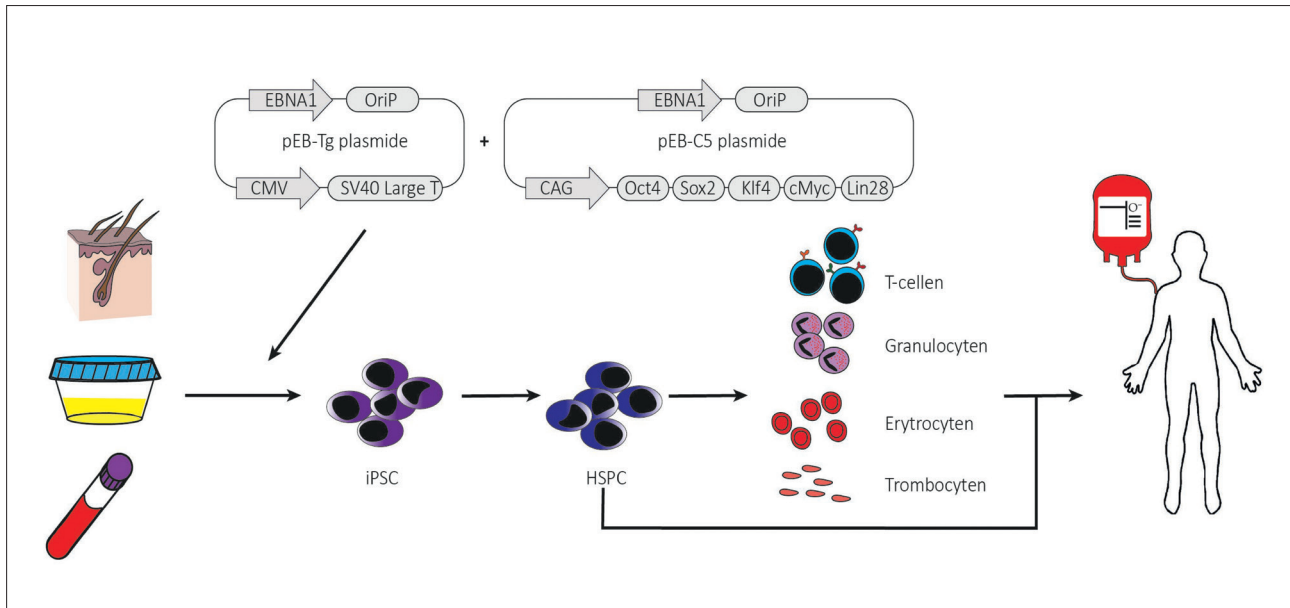
**Keywords:** induced pluripotent stem cells, iPSC, reprogramming, hematopoiesis

ONTVANGEN 12 JULI 2018, GEACCEPTEERD 25 SEPTEMBER 2018

## INLEIDING

Het menselijk lichaam bestaat uit een grote variëteit aan verschillende celtypen met een veelzijdigheid aan specifieke functies welke voor een bepaalde tijdsperiode functioneren, waarna ze moeten worden vervangen. Stamcellen zijn verantwoordelijk voor de continue aanwas van nieuwe functionele cellen. Het in vitro kunnen kweken en uitrijpen van stamcellen naar een specifieke somatische cel en de toepassing hiervan binnen het veld van regeneratieve medische wetenschap zou een enorme stap voorwaarts zijn, zeker als we het groeiende orgaandonorkort in ogenschouw nemen. Combineren we dit met de snelle ontwikkelingen binnen het veld van genetische manipulatie met behulp van CRISPR/CAS9, dan heeft dit veld de potentie om autologe en allogene regeneratieve geneeskunde te revolutioneren. De stamcellen bevatten twee belangrijke eigenschappen: synchrone celdeling en asynchrone celdeling. Synchrone celdeling resulteert in twee nieuwe stamcellen en wordt ook wel zelfvernieuwingdeling genoemd met behoud van stamceleigenschappen. Deze belangrijke eigenschap zorgt ervoor dat de stamcellen niet verloren gaan. Asynchrone celdeling leidt tot uitrijping naar een cel met een specifieke rol in het lichaam, bijvoorbeeld een erytrocyt of een lymfocyt vanuit de hematopoëtische stamcel (HSC). Bij synchrone celdelingen blijven de stamceleigenschappen behouden, wat niet het geval is bij asynchrone celdeling. Het volwassen menselijk lichaam is gecompartmentaliseerd in functionele eenheden (lever, bloed, hersenen, enz.). Over het algemeen heeft elk compartiment zijn eigen stamcelvoorraad die de continuïteit van het orgaan waarborgt. Voorbeelden zijn de hematopoëtische, of bloedvormende, stamcel in het beenmerg die de voorlopercel is voor alle functionele bloedcellen en de stamcellen in de crypt van de darmen. Een stamcel rijpt dus uit in een veelvoud van cellen met verschillende eigenschappen en functies die het voortbestaan van het orgaan waarborgen. Er bestaat restrictie- of differentiatie-bias van stamcellen voor een bepaalde set cellen, een HSC kan bijvoorbeeld niet uitrijpen tot een zenuwcel; dit noemen we multipotentie. Het feit dat bepaalde stamcellen zeer moeilijk te oogsten zijn uit een volwassen lichaam en dat bepaalde stamceleigenschappen moeilijk *ex vivo* te behouden zijn in kweekmedia, is een sterke drijfveer om te zoeken naar condities die omnipotentie in stamcellen reguleert en behoudt. Pluripotente stamcellen, in tegenstelling tot de multipotente stamcellen in de verschillende weefsels, kunnen per definitie differentiëren tot elke gewenste somatische cel van het lichaam. Embryonale stamcellen hebben deze specifieke eigenschap. Er is nog een stap hoger in stamcelpotentie, namelijk de totipotente cellen die ook nog extra-embryonale cellen kunnen vormen zoals de cellen in de dooierzak. Het beste voorbeeld van een totipotente cel is

de bevruchte eicel. Hoewel het pas sinds zeer kort mogelijk is om muizen-oöcyten in een ongedifferentieerde status te houden, vergen deze protocollen echter zeer specifieke kennis, waardoor deze technieken nog niet wijdverspreid zijn.<sup>1</sup> Er is een alternatief, namelijk de embryonale stamcellen die ontstaan in het blastocyste stadium tijdens de embryogenese. De eerste embryonale stamcellen (ES-cellen) van muizen zijn geïdentificeerd en gekweekt door Evans Kaufman in 1981 en de humane ES-cel in 1998 door James Thomson.<sup>2,3</sup> Bradley et al. lieten zien dat muizen-ES-cellen kunnen worden gebruikt om chimère muizen te maken, waarbij ES-cellen bijdragen tot het ontstaan van alle kiemlagen (een voorwaarde voor pluripotentie, ze zijn dus niet meer totipotent).<sup>4</sup> Het isoleren van ES-cellen uit humane embryo's ligt begrijpelijkerwijs ethisch zeer gevoelig. Zodoende is men op zoek gegaan naar ES-cel-alternatieven met vergelijkbare specificaties. Aan het einde van de vorige eeuw en in het begin van de 21<sup>e</sup> eeuw heeft men aangetoond dat somatische nucleusinjectie in oöcyten of fusie met ES-cellen een mate van pluripotentie kan geven.<sup>5-7</sup> Dit toonde aan dat er in de ES-cellen en oöcyten bepaalde factoren zitten die pluripotentie kunnen induceren. Transcriptoomvergelijkingen tussen bijvoorbeeld verschillende ES-cellen en andere cellen in het vroege embryo hebben in die tijd een groot aantal kandidaatfactoren geïdentificeerd die eventueel verantwoordelijk zouden kunnen zijn voor de pluripotente identiteit. Dit leidde in 2006 tot het artikel van Takahasi et al. waarin een 24-tal bekende pluripotente DNA-replicaties, oftewel transcriptionele regulatoren, door middel van reductie-experimenten werden teruggebracht tot een viertal cruciale transcriptiefactoren, OCT3/4, SOX2, c-Myc en KLF4 (OSMK), die nodig zijn om muizenfibroblasten te herprogrammeren naar een onsterfelijke pluripotente staat.<sup>8</sup> Deze geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC's) kunnen in vitro uitrijpen tot alle embryonale kiemlagen, een belangrijke graadmeter voor pluripotentie. Injectie van deze eerstegeneratie-iPSC's in muizenembryo's gaf echter nog geen chimère muizen, hiervoor is een vijfde transcriptiefactor, NANOG, nodig.<sup>9,10</sup> Deze zogenoemde tweedegeneratie-iPSC's zijn identiek aan muizen-ES-cellen en kunnen net als ES-cellen chimère muizen genereren wanneer ze worden geïnjecteerd in embryo's. Dezelfde groep bewees in 2007 dat een identieke humane set transcriptiefactoren ook kan worden gebruikt om humane fibroblasten te herprogrammeren tot een pluripotente staat vergelijkbaar met humane ES-cellen.<sup>11</sup> Humane ES-cellen en iPSC's zijn qua morfologie en groeifactor-afhankelijkheid verschillend van muizen-ES-cellen. Het verschil zit hoogstwaarschijnlijk in de afkomst van deze cellen in het embryo, waarbij muizen-ES-cellen in een vroeger stadium (blastocyste) zitten en kunnen worden gehandhaafd (naïeve stamcelstatus)



**FIGUUR 1.** Van somatische cel naar klinische toepassingen met behulp van iPSC. Verschillende bronnen kunnen worden gebruikt om iPSC te genereren (bloed, urine, fibroblasten). Door niet-integrerende vectoren te gebruiken kunnen de gedifferentieerde cellen worden getransfuseerd zonder de zorg van reactivatie of genomische instabiliteit.

dan de humane ES-cellen (post-implantatiestadium, geïmpregneerd stamcelstadium) die afhankelijk zijn van FGF2 en TGF $\beta$ . Recentelijk is aangetoond dat humane iPSC's en ES-cellen ook in de naïeve staat kunnen worden teruggebracht door een combinatie van signaaltransducerremmers, door de stimulatie van LIF1 en remming van de TGF $\beta$ - en FGF2-siginaaltransductie.<sup>12</sup> Deze naïeve staat van iPSC's en ES-cellen kunnen ook hybride chimère embryo's genereren, wat normale humane iPSC's en ES-cellen niet kunnen.<sup>12</sup> Met het bovengenoemde is aangetoond dat humane iPSC's kunnen bijdragen aan alle kiemlagen en dus per definitie pluripotente stamcellen zijn. Het feit dat iPSC's onsterfelijk zijn, genetisch gemodificeerd kunnen worden, intrinsiek het kenmerk hebben om te differentiëren naar elke somatische cel en in een naïeve en non-naïeve staat te expanderen zijn, maakt iPSC's de ideale bron voor regeneratieve geneeskunde. In dit artikel geven wij een overzicht van de laatste iPSC-ontwikkelingen op gebied van: 1) welke re-programmeringstechnieken zijn er, 2) welke somatische cel te gebruiken om te re-programmeren en waarom, 3) differentiatieprotocollen en 4) toepassingen en de vertaling naar de kliniek. De nadruk in dit artikel ligt op het regenereren van hematopoëtische cellen vanuit iPSC.

## MANIEREN VAN HERPROGRAMMEREN

Na de introductie van de 'Takahashi'-transcriptiefactoren OSMK om cellen te herprogrammeren op zowel transcriptoom-, epigenoom- en stofwisselingsniveau naar een plu-

ripotente staat in zowel muis- als humane cellen, zijn er verschillende methoden ontwikkeld om deze factoren te introduceren (samengevat in referentie 13 en 14).

De meest gebruikte methode om OSMK te introduceren in cellen is met retrovirale vectoren. Deze vectoren integreren willekeurig in het genoom wat een risico op integratie-gemedieerde activatie of remming van genen kan geven. Als zo'n integratie bijvoorbeeld plaatsvindt in een tumorsuppressiegen, waardoor dat gen niet meer kan worden afgelezen, dan kan dat een predispositie geven tot behandelinggerelateerde ziekten. Snel daarna werd een lentivirale polycistronische vector gemaakt waarbij OSMK in één construct zitten.<sup>15</sup> Het voordeel van deze methoden is dat ze efficiënt zijn (0,4%) en zeer makkelijk zijn toe te passen.<sup>13</sup> Het grote nadeel zit in het feit dat OSMK worden geïntegreerd in het genoom en dus niet voldoen aan de klinische eisen voor celtherapie. Een uitzondering hierop zijn de cellen die worden uitgerijpt vanuit iPSC's en die geen genetisch materiaal bevatten, zoals de erythrocyten en de trombocyten.

Om iPSC's te maken die wel kunnen worden gebruikt in klinische toepassingen zijn niet-integrerende herprogrammeringstechnieken ontwikkeld. Eén daarvan is met behulp van het Sendai-RNA-virus, dat zorgt voor hoge expressie van de factoren onafhankelijk van de celcyclus, maar wel een lagere efficiëntie heeft (0,077%) dan de traditionele methoden.<sup>16</sup> Het virus wordt bij elke passage van de iPSC's verdunt, waardoor het uiteindelijk niet detecteerbaar/aanwezig is. De prijs per gegeneerde lijn met deze methode ligt  $\pm$  5 x hoger

dan bij andere vectoren. Om virussen helemaal te omzeilen kan worden gekozen voor lipofectamine of elektroporatie. Op deze manier wordt geen viraal DNA of RNA geïntroduceerd in de cellen en vindt geen integratie plaats in het genoom. Deze episomale methoden hebben ook als voordeel dat de vectoren langzaam verdunnen bij de passages van de iPSC's (zie *Figuur 1*). Hierdoor is er na enkele passages een 'schone' iPSC-lijn die kan worden gebruikt voor klinische toepassingen. De efficiëntie is beduidend lager dan bij andere niet-integrerende methoden (0,013%) en er blijft een geringe kans op integratie van de vector in het genoom.<sup>17,18</sup> Naast bovengenoemde methoden die zorgen voor introductie van de OSMK-'template' op genetisch niveau is het ook mogelijk om deze als recombinante eiwitten te introduceren. Hierbij worden de factoren geproduceerd met meerdere argininelinkers, zodat ze over het celmembraan kunnen migreren. Het voordeel van het gebruik van recombinante eiwitten is dat er geen genetische manipulatie plaatsvindt, waardoor de transitie naar klinische toepassingen laagdrempeliger wordt. Op dit moment is deze aanpak echter nog zeer ineffectief (0,001%) en zijn er hoge kosten aan verbonden ( $\pm$  25-30 x duurder dan lentiviraal).<sup>19</sup> In plaats van de recombinante eiwitten te introduceren, kan er ook voor worden gekozen om op mRNA de OSMK te introduceren. Dit is een zeer effectieve (1,4%) en snelle manier om iPSC's te maken, mede omdat er niet hoeft te worden gescreend op virale integraties.<sup>20</sup> Het probleem bij het gebruik van mRNA is dat er een immuunreactie optreedt in de cellen tegen het vreemde RNA, dat kan leiden naar een niet-optimale of zelfs niet-werkende herprogrammering. Om de immuunreactie te stoppen zijn verschillende anti-interferonmoleculen getest, maar tot dusver zonder succes, waardoor deze methode uit de gratie begint te vallen. Uit studies bij embryonale stamcellen en tijdens embryonale ontwikkeling is er een duidelijke rol voor miRNA bij de regulatie van pluripotentie gevonden, die kan worden geëxploiteerd voor herprogrammering. Zo zijn miR-302/367 directe doelen van OCT4 en zijn hun expressieniveaus met elkaar verbonden. Het gebruik van miRNA's miR-200c/302/369 kan zonder de toevoeging van OSMK cellen herprogrammeren, met lage efficiëntie (0,01%).<sup>21</sup> Door een combinatie te maken met de suppressie van HDAC2 kan deze efficiëntie naar 10% worden gebracht, wat het de meest effectieve methode maakt op dit moment. Als laatste methode is het mogelijk om met een cocktail van zeven kleine moleculen cellen te herprogrammeren tot pluripotente staat. Deze moleculen zijn epigenetische regulatoren: natriumvalproaat, DzNEP en de LSBI-remmer (tranylcypromine), GSK3-remmer (CHIR), 'transforming growth factor-beta'-remmer (616452) en twee moleculen die OCT3/4-expressie positief reguleren. Deze manier om iPSC's te maken

heeft als voordeel dat het transgenvrij is en protocoltechnisch een makkelijke manier van herprogrammeren, doordat deze agonisten/antagonisten vrij over het celmembraan kunnen bewegen. Met deze aanpak is een efficiëntie haalbaar van 0,2% en de cellen kunnen worden gebruikt voor klinische toepassingen.<sup>22</sup> Deze methode is echter enkel succesvol uitgevoerd op somatische muizencellen en voornamelijk nog niet op humane somatische cellen.

Hoewel er dus verschillende herprogrammeringsmethoden zijn, is er op het moment nog geen goede analyse gemaakt van de verschillen tussen de resulterende iPSC's. Het is zelfs zo dat er een hoge mate van variabiliteit is tussen iPSC-klonen, zelfs binnen dezelfde herprogrammeringsmethode in dezelfde herprogrammeringsronde. Het is dus zeer waarschijnlijk dat de iPSC's gegenereerd uit al deze verschillende herprogrammeringsprotocollen kwalitatief verschillen qua pluripotentie, differentiatiecapaciteit, genomische stabiliteit en epigenetische opmaak. De moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan deze verschillen moeten worden opgelost, zodat gestandaardiseerde, kwalitatief hoogstaande iPSC's kunnen worden gemaakt voor gebruik in de kliniek.

## WELKE SOMATISCHE CEL TE RE-PROGRAMMEREN?

Takahashi et al. gebruikten fibroblasten (huidcellen) als somatisch materiaal om te herprogrammeren. Kort na deze ontdekking is geprobeerd of andere somatische cellen ook met dezelfde transcriptiefactormix te herprogrammeren waren. In 2010 werd de eerste herprogrammering van cellen gekweekt uit bloed beschreven en in 2012 de eerste herprogrammering vanuit cellen in de urine. Daarmee rees de vraag: maakt het voor de kwaliteit en toepassing van een iPSC uit welke somatische cel men herprogrammeert? Met andere woorden, is een iPSC gemaakt van bloedcellen hetzelfde als een iPSC gemaakt vanuit fibroblasten/urine? Hierbij moet vooral de herprogrammering van het epigenetisch landschap in ogenschouw worden genomen. Epigenetica beschrijft de omkeerbare veranderingen op het DNA of eiwitten betrokken bij de macrostructuur van het DNA (bijvoorbeeld histonen), die het aflezen van genen positief of negatief beïnvloedt. Verschillende somatische cellen kunnen een zeer sterk verschillend epigenetische 'vingerafdruk' bevatten, wat wordt bepaald tijdens de differentiatie van stamcellen tot die specifieke somatische cel. Deze epigenetische patronen bepalen mede welke regio's van het genoom dicht, open en/of open of dicht kunnen gaan, afhankelijk van specifieke stimuli. Sterker nog, differentiërende cellen kunnen worden onderscheiden door specifieke open structuren die kunnen worden herkend door specifieke epigenetische signaturen. Het aberrant aanzetten van specifieke structuren tijdens dif-

ferentiaties of in somatische cellen kan leiden tot ziektebeelden, waaronder leukemie/tumorformatie.<sup>23</sup> Dus in hoeverre wordt het epigenetische landschap ook ge-herprogrammeerd vergelijkbaar met het landschap van een pluripotente stamcel? In antwoord op deze vraag heeft een groot aantal groepen het epigenetische landschap van iPSC van verschillende somatische oorsprong met elkaar vergeleken. Het bleek dat na herprogramming nog steeds een epigenetische vingerafdruk van de somatische oorsprong terug te vinden was, het zogenoemde epigenetische geheugen. Voor een aantal toepassingen bleek dat men het beste de somatische cel kon herprogrammeren die men ook weer vanuit de iPSC zou willen maken, bijvoorbeeld bètacellen uit de pancreas.<sup>24</sup> Andere groepen hebben laten zien dat dit epigenetische geheugen met elke passage van iPSC's afneemt en dat na 13-20 passages het epigenetische patroon tussen iPSC's van verschillende somatische oorsprong niet meer van elkaar te onderscheiden is.<sup>25,26</sup> Hoewel iPSC's van verschillende somatische oorsprong dus wat betreft pluripotentie en morfologie sterk op elkaar lijken, zijn er dus wel degelijk verschillen en de vraag rijst of tijdens de passages op specifieke regio's in het genoom toch nog een zekere mate van epigenetische vingerafdruk achterblijft. Om dat te beantwoorden moet men naar individuele genen en regulatoire elementen of andere structuren in het genoom kijken, wat praktisch ondoenlijk is. Doordat het mogelijk is dat er na herprogramming epigenetische vingerafdrukken kunnen blijven bestaan die cruciaal zouden kunnen zijn voor de differentiatie naar erythrocyten of trombocyten, worden bij Sanquin om dit te ondervangen erytroblasten of megakaryoblasten ge-herprogrammeerd.

## DIFFERENTIATIE VAN IPSC'S NAAR HEMATOPOËTISCHE CELLEN

iPSC's kunnen differentiëren naar verschillende somatische cellen, zoals specifieke neuronen, spiercellen, insulineproducerende bètacellen of bloedcellen. Er zijn verschillende methoden die kunnen worden gebruikt om iPSC's te differentiëren en er bestaat (nog) geen consensus over wat de meest optimale manier van differentiatie is. Dit geldt ook voor de differentiatie naar hematopoëtische cellen en zelfs binnen een specifieke hematopoëtische lijn. Voor de differentiatie naar erythrocyten zijn bijvoorbeeld verschillende protocollen gepubliceerd.<sup>27-31</sup> De eerste en tot op heden nog steeds meest gebruikte methode is het maken van embryonale lichamen (EB), wat voor de introductie van iPSC's werd gebruikt om ES-cellen te differentiëren. EB kunnen op meerdere manieren worden gemaakt, maar komen in principe op hetzelfde neer, het spontaan of geforceerd laten samenklonteren van cellen zodat deze driedimensionale bolvormige sferen vormen.<sup>32-33</sup> Deze EB zijn een equivalent van de blas-

tulastadia tijdens de embryonale ontwikkeling. Net zoals in de blastula vindt in deze EB-differentiatie naar alle drie de kiembladen, ectoderm, endoderm en mesoderm, plaats. De hoeveelheid cellen waaruit een EB wordt gevormd bepaalt in hoge mate de efficiëntie van differentiatie naar de verschillende kiemlagen. Mesodermale, en dus hematopoëtische, specificatie is bijvoorbeeld optimaal als de EB worden gevormd uit 1.000-3.000 ES-cellen of iPSC's.<sup>32,34</sup> De geproduceerde cellen kunnen worden gezuiverd (met behulp van MACS-isolatie van CD34<sup>+</sup>-cellen e.d.) en verder uitgerijpt naar het gewenste celtype. Hematopoëtische differentiatie tot effectorcellen gebeurt vaak door de cellen samen te kweken met stromale cellen (MS-5 of OP-9)<sup>14,28,30,35</sup> Naast EB-geïnduceerde differentiatie zijn ook methoden ontwikkeld die direct vanuit de iPSC-kolonie de differentiatie starten; gecombineerd met 'single'-celpassage van iPSC heeft deze techniek tot voordeel dat het proces beter te monitoren/controleerbaar is.<sup>31</sup> Voorbeelden hiervan zijn 'single'-cel-iPSC's die in suspensie worden gedifferentieerd en de geïnduceerde koloniedifferentiatie die vanuit een 2D-iPSC-monolaag begint.<sup>31,36-38</sup> Tijdens de differentiatie kunnen verschillende niet-GMP-matrices of cellen worden gebruikt als groeisubstraat waaronder, muizen embryonale fibroblasten (MEF's), matrigel of Geltrex. Deze zijn echter niet klinisch toepasbaar, wat de vertaalslag bemoeilijkt. GMP-alternatieven zijn de verschillende recombinante eiwitcoatings zoals vitronectin en laminin. Deze coatings zijn makkelijker te verwerken, hebben minder variaties tussen batches en zijn daarom beter geschikt voor productiedoeleinden. De efficiëntie van het differentiëren van iPSC's op deze coatings is echter niet altijd vergelijkbaar met de niet-GMP-alternatieven en zal nog moeten worden doorontwikkeld. Daarnaast is het voor alle differentiatiemethoden belangrijk om een juiste combinatie van groeifactoren te kiezen die de iPSC's richting het beoogde celtype sturen. Om cellen richting de hematopoëse te duwen, wordt in de eerste dagen van de kweek (0-6 dagen) vaak 'vascular endothelial growth factor' (VEGF) en 'bone morphogenic protein 4' (BMP4) gebruikt om het mesoderm te induceren waaruit in de embryo de hematopoëtische cellen ontstaan.<sup>36,38</sup> Na de mesoderm kiemlaag inductiefase wordt de differentiatie een specifieke kant opgestuurd met een set aan cruciale groeifactoren. Stemcellfactor (SCF) en trombopoëetine worden vrijwel altijd toegevoegd om de expansie en vitaliteit van de hematopoëtische voorlopercellen te bevorderen. Voor bijvoorbeeld de productie van erythrocyten zal men erythropoëetine toevoegen en voor granulocyten G-CSF. Daarnaast is het mogelijk specifieke transcriptiefactoren tot expressie te brengen waarvan bekend is dat ze instructief zijn voor een bepaalde differentiatielijn. Deze kunnen met behulp van een induceerbaar construct



op specifieke momenten tijdens de differentiatie worden aangezet. Zo is er voor de productie van megakaryocyten vanuit iPSC's met behulp van GATA1, FLI1 en TAL1 een specificatie van 90% haalbaar tegen 40-60% die met groeifactoren alleen over het algemeen haalbaar is.<sup>39</sup> Tijdens de differentiatie van iPSC's is nog veel winst te behalen met het sturen van de differentiatie naar een specifiek celtype. Deze kan door een optimaal gebruik en timing van groeifactoren, kleine moleculen, remmers, agonisten en de expressie van specifieke transcriptiefactoren nog sterk worden verbeterd. Hierop richt zich dan ook een significant gedeelte van het onderzoek.

Een van de conclusies uit onderzoek naar de ontwikkeling van embryo's is dat er verschillende fasen van hematopoëse zijn. De vraag rijst hoe de hematopoëse vanuit iPSC's zich verhoudt tot de embryonale ontwikkeling en welke fase van hematopoëse prevalent is en of dit beïnvloedbaar is. Deze vragen zijn belangrijk voor weefselregeneratietoepassingen van bijvoorbeeld effectorcellen voor transfusies of stamcellen voor transplantaties. Transplanteerbare hematopoëtische stamcellen (HSC) gedifferentieerd vanuit iPSC's zouden normale autologe en allogene transplantaties kunnen vervangen (de heilige graal van hematopoëtische differentiatieprogramma's vanuit ES-cellen en iPSC's). Op dit moment is het technisch nog niet mogelijk om HSC's in vitro te kweken vanuit iPSC's, hoewel ze wel intrinsiek in staat zijn om HSC's te genereren. Dit blijkt uit het feit dat transplanteerbare CD34<sup>+</sup>-HSC's, die afkomstig zijn uit teratomas geïnduceerd door injectie van iPSC's in NOD-SCID-muizen, voor langdurige herpopulatie van het beenmerg zorgen. Er bestaat dus de noodzaak om de vroege hematopoëse in het embryo en tijdens iPSC-differentiatie te vergelijken om zodoende de correcte differentiatiesignalen te kunnen geven die leiden tot definitieve HSC-afhankelijke hematopoëse. Embryonale hematopoëtische effectorcellen hebben andere kenmerken dan adulte effectorcellen en HSC's ontstaan uit een zeer specifieke endotheelpopulatie tijdens de embryonale ontwikkeling. Hematopoëtische ontwikkeling kan worden opgedeeld in vier fasen. Dooierzak primitieve (eerste fase) en definitieve erytroïd-myeloid progenitor (EMP; tweede fase) hematopoëse vinden plaats onafhankelijk van een HSC. HSC's differentiëren uit specifieke endotheelcellen in de embryonale aorta en koloniseren de foetale lever, wat de derde fase van stamcel-afhankelijke hematopoëse inleidt. Tijdens de late ontwikkeling van het embryo verplaatsen deze stamcellen zich naar het beenmerg en komt de volwassen hematopoëse op gang (vierde fase). Deze verschillende fasen zijn bijvoorbeeld te volgen door naar de hemoglobineketens te kijken tijdens de rodebloedcelontwikkeling. De eerste fase aan hematopoëse in de dooierzak geeft epsilon/

zeta-hemoglobine.<sup>40</sup> Foetale lever- en EMP-hematopoëse geeft alfa/gamma-hemoglobine en volwassen beenmerghematopoëse geeft alfa/bèta-hemoglobine. Rodebloedcelprecursors uitgerijpt vanuit iPSC's geven een gemengd beeld van laag epsilon-, hoog gamma- en laag tot geen bèta-globine.<sup>31</sup> Het feit dat er geen HSC's worden gevormd en er voornamelijk gamma- en in mindere mate epsilon-globineketens tot expressie komen, suggereert dat er voornamelijk EMP- (tweede fase), in mindere mate embryonale/dooierzak-hematopoëse en geen tot nauwelijks foetale/volwassen (derde/vierde fase) hematopoëse plaatsvindt. Differentiatie naar hematopoëtische cellen geeft dus tot dusver vooral een foetaal programma in vitro.<sup>28,30,31</sup> Onbekend is of HSC-onafhankelijke EMP-hematopoëse de juiste functionele effectorcellen genereert die bruikbaar zijn als transfusieproduct. Het is dus cruciaal om de condities in vitro na te bootsen die compatibel zijn met de formatie van definitieve/volwassen hematopoëse om zodoende HSC-afhankelijke hematopoëse (derde/vierde fase) te krijgen vanuit iPSC's.

## DE TOEPASSING VAN GEÏNDUCEERDE PLURIPOTENTE STAMCELLEN IN DE KLINIEK

Zoals aangegeven zou de combinatie van onsterfelijke iPSC's die kunnen differentiëren tot elke gewenste somatische cel en de snelle ontwikkelingen op het gebied van genoommanipulatie een sterke impuls kunnen geven aan het regeneratieve medische veld. Het niet-onrealistische vooruitzicht om hematopoëtische stamcellen te kweken uit iPSC's, zie hierboven, heeft de potentie om de 'disruptieve' technologie te worden die reguliere (beenmerg)transplantaties gaat vervangen. Autologe transplantaties zouden dan kunnen worden gedaan met HSC's gekweekt uit iPSC's van de patiënt waarin het genomische defect is gerepareerd, bijvoorbeeld met behulp van CRISPR/CAS9-actige technieken. Voorbeelden zijn de sikkelcelmutatie in bètaglobine of mutaties in de IL2-gamma-receptor die 'X-linked severe combined immunodeficiency' (SCID) veroorzaakt. Behalve autoloog zouden ook allogene transplantaties met HLA-gematchte iPSC-lijnen tot de mogelijkheden behoren. Hiervoor is bijvoorbeeld recentelijk het 'iPSC stock project' in het leven geroepen door het 'Center for iPSC Research and Application' in Japan. Binnen dit project zullen cellen van donoren met homologe HLA-haplotypen worden gebruikt om een iPSC-bank te maken. De bank heeft zich als doel gesteld om voor 2022 voor de gehele Japanse bevolking HLA-gematchte iPSC's te hebben. Uit deze bank kunnen dan specifieke gematchte iPSC's worden opgekweekt voor regeneratieve doeleinden. Een andere toepassing ligt in andere cellulaire therapieën, bijvoorbeeld het maken van tumorspecifieke T-cellen of mesenchymale

stromale cellen, maar ook rode bloedcellen en plaatjes zoals actief nagestreefd door Sanquin.<sup>31,41,42</sup> De onsterfelijke natuur van iPSC's maakt ze uitermate geschikt om genetisch gemodificeerde T-cellen te produceren, bijvoorbeeld 'chimeric antigen receptor' (CAR) of antigeenspecifieke T-celreceptor (TCR-T)-cellen. Deze zouden zeer bruikbaar zijn binnen adoptieve immunotherapieën specifiek gericht tegen allerlei ziekten inclusief kanker/leukemie. Een aantal bedrijven is op het moment actief bezig om adoptieve T-celtherapieën te ontwikkelen door dit soort genetisch gemodificeerde of patiëntspecifieke tumorreactieve T-cellen te differentiëren vanuit iPSC's. Hierbij zullen de celopbrengsten groter zijn dan bij autologe T-celconcentraten, waarbij het soms lastig is om voldoende patiënt-T-cellen te bemachtigen. Lange ex-vivo-expansieprotocollen zorgen voor T-celuitputting ('exhaustion'), dat wordt gekenmerkt door verminderde effectorfunctie, mede veroorzaakt door expressie van T-celfunctieremmende receptoren en groeifactoren, waardoor de T-cel niet goed infecties en tumoren kan bestrijden. Het kweken van T-cellen vanuit iPSC's kan deze uitputting voorkomen, omdat massieve en langdurige expansie van een kleine pool patiëntcellen niet meer nodig zal zijn. Buiten deze directe klinische toepassingen worden iPSC's op het moment vooral gebruikt voor fundamenteel onderzoek, het testen van klinisch relevante chemische stoffen of andere moleculen, en als ziektemodellen. Het gebruik van iPSC's in een klinische setting is nog wel onderhevig aan enkele complicaties die moeten worden geadresseerd voordat deze veilig kunnen worden toegepast in een klinische setting.

Ten eerste hebben iPSC's de potentie om teratomas te maken in muizen en het is niet onredelijk te denken dat deze tumorogene potentie ge-extrapolleerd kan worden naar de menselijke situatie. Tijdens het differentieproces bestaat de mogelijkheid dat een klein aantal ongedifferentieerde iPSC's in het uiteindelijke product achterblijven. Deze vervuiling zou na toepassing bij patiënten eventueel tot tumorformatie kunnen leiden zoals al is geobserveerd bij muizen.<sup>43</sup> Het is dus van cruciaal belang om de eventuele aanwezigheid van pluripotente stamcellen of andere ongewenste celpopulaties na differentiatie te identificeren en uit het eindproduct te verwijderen. Voor de toekomstige productie van erythrocyten of trombocyten, zoals nu wordt onderzocht bij Sanquin, is dit makkelijker te realiseren dan met kernhoudende transfusieproducten zoals neutrofielen en levercellen. Ten eerste omdat er goede methoden bestaan om kernhoudende cellen te scheiden van erythrocyten of trombocyten, ten tweede omdat zeer nauwkeurig met behulp van PCR-technieken kan worden gekeken naar de aanwezigheid van intact genomisch DNA (en dus kernhoudende cellen) en ten derde het uiteindelijke product zou kunnen worden bestraald, wat

celdelingen onmogelijk maakt. De eerste toepassing binnen het iPSC-veld zouden dus producten kunnen zijn zonder celkernen.

Daarnaast wordt op dit moment vooral gebruikgemaakt van herprogrammeringstechnieken die een vingerafdruk achterlaten in het genoom. Door deze vingerafdruk in het genoom zouden belangrijke tumorsuppressie-, oncogene of regulatoire genomische elementen kunnen worden aangedaan, wat toepassing in de kliniek bemoeilijkt, zo niet onmogelijk maakt. Vandaar dat in de laatste jaren is geïnvesteerd in de productie van transgenvrije iPSC's, waarvan een aantal technieken al succesvol blijkt (zie de vorige hoofdstukken). In het bijzonder zijn de RNA-transfectie, episomale en chemische herprogrammering belangrijke stappen voorwaarts. Dit punt is dus op te lossen door deze nieuwe manieren van herprogrammeren waardoor enkel de intrinsieke tumorogene capaciteit van iPSC's als probleem resteert.

Als laatste en minst belicht, iPSC's en cellen afkomstig van iPSC's zouden immunogeen kunnen zijn. Zhao et al. hebben laten zien dat teratomas van iPSC's geïnjecteerd in syngene muizen immunologisch worden afgestoten in tegenstelling tot syngene ES-cellen.<sup>44</sup> Dit wordt evenwel door andere groepen genuanceerd of ontkracht met de notie dat de afstoting celtype-afhankelijk is of helemaal niet plaatsvindt.<sup>45,46</sup> Dit geeft aan dat er nog meer vergelijkend onderzoek nodig is naar dit fenomeen.

De toepassing van iPSC's in de kliniek staat pas in de kinderschoenen en wordt buiten optimalisatie van differentiatieprotocollen ook vooral tegengehouden door de angst voor levensbedreigende behandelingen-gerelateerde ziekten zoals tumoren. Op het moment van schrijven is er één klinische test uitgevoerd in Japan (door de groep van Masayo Takahashi) voor de behandeling van maculadegeneratie (Riken, CDB, persbericht). In deze studie zijn fibroblasten van één patiënt ge-herprogrammeerd tot iPSC-lijnen. Eén van deze lijnen werd gedifferentieerd tot retinapigment epitheelcellen en getransplanteerd achter de retina van de patiënt wat een sterk verbeterde visie gaf. Uit deze studie blijkt de toepasbaarheid van iPSC's, maar ook het gevaar aangezien behandeling van een tweede patiënt werd stopgezet in verband met het feit dat er een mutatie in een oncogen was gevonden in de te gebruiken iPSC-kloon ([www.ipscell.com/2015/07/first-ipscstop](http://www.ipscell.com/2015/07/first-ipscstop)). Deze problematiek kan worden overwonnen met nieuwe steeds goedkoper wordende 'next generation whole genome sequencing'-technieken iPSC-lijnen genetisch te valideren en klonen te selecteren zonder aberraties. Deze validatie van het uiteindelijke product is lastig bij transfusie/transplantatie van miljoenen cellen waarvan idealiter elke cel individueel zal moeten worden gescreend; een ondoenlijk vooruitzicht. Onderzoek naar de mutatedruk van iPSC's

## AANWIJZINGEN VOOR DE PRAKTIJK

- 1** iPSC kunnen worden gemaakt door somatische cellen te herprogrammeren met een cocktail van specifieke transcriptiefactoren. Bij Sanquin worden erythroblasten geherprogrammeerd die worden opgegroeid uit kleine (<5 ml) hoeveelheden bloed.
- 2** iPSC hebben de potentie om uit te rijpen naar elke cel binnen het menselijk lichaam.
- 3** Ondanks het enorme potentieel van iPSC, zijn klinische toepasbare producten afkomstig van iPSC's nog niet gerealiseerd tot op heden.
- 4** Derhalve is het lastig om voor de clinicus practicus een kader te scheppen.

tijdens normale kweek en differentiatie moet daarom beter in kaart worden gebracht. Daarnaast moet de pertinentie van eventuele risico's door van iPSC's afgeleide producten goed in kaart worden gebracht, mede met behulp van relevante diermodellen. Tegelijkertijd moet worden achterhaald waar de variabiliteit binnen een iPSC-populatie vandaan komt om een gestandaardiseerd uitgangspunt te verkrijgen. Deze variatie zou epigenetisch van aard kunnen zijn, waardoor ook epigenetica een belangrijke validatiestap zou kunnen worden.

## CONCLUSIE

Uit dit artikel blijkt dat het iPSC-veld zich, 12 jaar na de ontdekking van OSMK-herprogramming, langzaam verschuift van veelbelovende techniek naar de kliniek en dat nieuwe ontwikkelingen de weg naar de kliniek kunnen verkorten en versoepelen. Als de enorme vorderingen die zijn gemaakt in dit zeer jonge veld een indicator mogen zijn, dan is het niet onrealistisch om in het komende decennium de eerste grote klinische vertaalslagen te verwachten.

## REFERENTIES

1. Hikabe O, et al. Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature* 2016;539:299-303.
2. Evans MJ, et al. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154-6.
3. Thomson JA, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-7.
4. Bradley A, et al. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 1984;309:255-6.
5. Wilmut I, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:810-3.
6. Cowan CA, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 2005;309:1369-73.
7. Tada M, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* 2001;11:1553-8.
8. Takahashi, et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
9. Okita K, et al. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007;448:313-7.
10. Meissner A, et al. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2007;25:1177-81.
11. Takahashi K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861-72.
12. Gafni O, et al. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* 2013;504:282-6.
13. Schlaeger TM, et al. A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nat Biotechnol* 2015;33:58-63.
14. Augustyniak J, et al. Reprogramming of somatic cells: possible methods to derive safe, clinical-grade human induced pluripotent stem cells. *Acta Neurobiol Exp* 2014;74:373-82.
15. Warlich E, et al. Lentiviral vector design and imaging approaches to visualize the early stages of cellular reprogramming. *Mol Ther* 2011;19:782-9.
16. Fusaki N, et al. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009;85:348-62.
17. Okita K, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPSC cells. *Nat Methods* 2011;8:409-12.
18. Varga E, et al. Generation of human erythroblast-derived iPSC line using episomal reprogramming system. *Stem Cell Res* 2017;25:30-3.
19. Kim D, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009;4:472-6.
20. Warren L, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 2010;7:618-30.
21. Anokye-Danso F, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2011;8:376-88.
22. Hou P, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* 2013;341:651-4.



23. Whyte WA, et al. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* 2013;153:307-19.
24. Bar-Nur O, et al. Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell* 2011;9:17-23.
25. Kim K, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010;467:285-90.
26. Polo JM, et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2010;28:848-55.
27. Dias J, et al. Generation of red blood cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 2011;20:1639-47.
28. Chang CJ, et al. Production of embryonic and fetal-like red blood cells from human induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2011;6:e25761.
29. Iwao T, et al. Differentiation of human induced pluripotent stem cells into functional enterocyte-like cells using a simple method. *Drug Metab Pharmacokin* 2014;29:44-51.
30. Yang CT, et al. Human induced pluripotent stem cell derived erythroblasts can undergo definitive erythropoiesis and co-express gamma and beta globins. *Br J Haematol* 2014;166:435-48.
31. Hansen M, et al. Efficient production of erythroid, megakaryocytic and myeloid cells, using single cell-derived iPSC colony differentiation. *Stem Cell Res* 2018;29:232-44.
32. Ng ES, et al. Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. *Blood* 2005;106:1601-3.
33. Kurosawa H, et al. A simple method for forming embryoid body from mouse embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng* 2003;96:409-11.
34. Moon SH, et al. Optimizing human embryonic stem cells differentiation efficiency by screening size-tunable homogenous embryoid bodies. *Biomaterials* 2014;35:5987-97.
35. Choi KD, et al. Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2009;27:559-67.
36. Feng Q, et al. Scalable generation of universal platelets from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 2014;3:817-31.
37. Wang Y, et al. Scalable expansion of human induced pluripotent stem cells in the defined xeno-free E8 medium under adherent and suspension culture conditions. *Stem Cell Res* 2013;11:1103-16.
38. Niwa A, et al. A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS One* 2011;6:e22261.
39. Moreau T, et al. Large-scale production of megakaryocytes from human pluripotent stem cells by chemically defined forward programming. *Nat Commun* 2016;7:11208.
40. Lim WF, et al. Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2013;4:71.
41. Themeli M, et al. Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy. *Nat Biotechnol* 2013; 31:928-33.
42. Kimbrel EA, et al. Mesenchymal stem cell population derived from human pluripotent stem cells displays potent immunomodulatory and therapeutic properties. *Stem Cells Dev* 2014;23:1611-24.
43. Nori S, et al. Long-term safety issues of iPSC-based cell therapy in a spinal cord injury model: oncogenic transformation with epithelial-mesenchymal transition. *Stem Cell Reports* 2015;4:360-73.
44. Zhao T, et al. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011;474:212-5.
45. Araki R, et al. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature* 2013;494:100-4.
46. Guha P, et al. Lack of immune response to differentiated cells derived from syngeneic induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2013;12:407-12.