

Reconstructie van een humane beenmerg omgeving in een muis

ten behoeve van preklinisch onderzoek naar acute leukemie en ziekte van Kahler (multipel myeloom)

Richard WJ Groen¹, Willy A Noort¹, Linda Lubbers-Aalders¹, Regina de Jong-Korlaar¹, Petra Moerer², Huipin Yuan³, Henk Lokhorst⁴ en Anton CM Martens^{1,2}

1 Divisie Biomedische Genetica Afdeling Celbiologie, UMC Utrecht, 2 Divisie Laboratoria en Apotheek, afdeling Immunologie, UMC Utrecht, 3 Xpand Biotechnology BV, Bilthoven, 4 Afdeling Hematologie, UMC Utrecht

Achtergrond

Een van de belangrijkste doelstellingen van proefdieronderzoek is het ontwikkelen van ziekte-modellen die zoveel mogelijk lijken op ziekteprocessen zoals die zich bij de mens afspelen. Het diermodel in ons onderzoek betreft een gehumaniseerd muizenmodel om daarin hematologische (= bloed) tumoren zoals acute leukemie en multipel myeloom (ziekte van Kahler) te bestuderen. Vervolgens worden de ontwikkelde modellen gebruikt voor het ontwikkelen van nieuwe therapeutische toepassingen voor de behandeling van dit type patiënten. Het grootste struikelblok in de afgelopen decennia bij dit onderzoek was, dat leukemiecellen en zeker multipel myeloomcellen, zeer hoge eisen stellen om te kunnen overleven dan wel te groeien. Met in het laboratorium opgekweekte cellijnen bleek het wel mogelijk om *in vitro* en *in vivo* onderzoek te verrichten aan leukemie en myeloom. Maar het bestuderen van tumorcellen die direct van leukemie of myeloompatiënten afkomstig waren, bleek, ook na tientallen jaren van pogingen, niet of nauwelijks mogelijk.

De reden daarvoor is dat deze cellen zeer speciale eisen - zoals die op hun 'natuurlijke' omgeving het beenmerg aanwezig zijn - stellen aan de 'lokale omgeving' waarin ze zich moeten zien te handhaven en die tot op heden simpelweg niet *in vitro* of *in vivo* gereproduceerd konden worden.

Doel/hypothese

Recent is deze situatie veranderd door slim gebruik te maken van een *in vivo* functionele test, die in het orthopedisch-/tissue engineerings (= weefsel maken) onderzoek wordt gebruikt voor het bepalen van de botvormende capaciteit van gekweekte stamcellen. Voor die toepassing worden *in vitro* stromale stamcellen uit humaan beenmerg opgekweekt, uitgezaaid op een (zeer poreus) keramisch dragermateriaal van calciumfosfaat, ook wel 'scaffolds' genoemd, die vervolgens onder de huid van muizen worden geplaatst (Afb. 1 en 2). Deze muizen hebben een verzwakt immuunsysteem zodat ze de humane cellen niet kunnen afstoten. Na zes tot acht weken vormt zich op het oppervlak van het scaffold materiaal een laagje humaan bot, met daarop »



Afbeelding 1. Een voorbeeld van een scaffold die beladen is met mesenchymale stromale cellen (MSC) die daarna één week in vitro in medium is doorgekweekt, en klaar is om geïmplant te worden. De cellen op de scaffold zijn gefixeerd en daarna blauw aangekleurd.



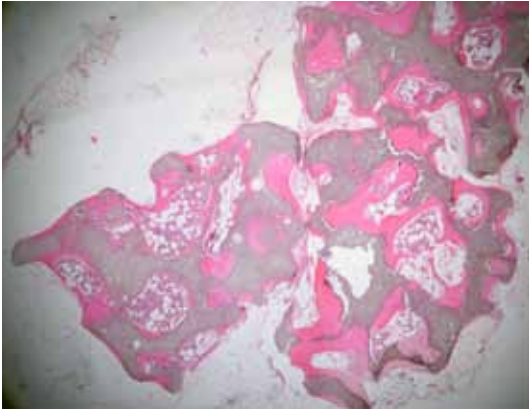
Afbeelding 2. Vanuit drie sneetjes in het midden op de rug, worden de MSC beladen scaffolds onder de huid geplaatst waar ze minimaal 6-8 weken blijven zitten. Op dat moment worden er humane cellen (leukemie- of multipel myeloom tumor cellen of normale stamcellen) geïnjecteerd. De uitgroei tot tumoren kan variëren van 2-10 maanden en weerspiegelt daarmee ook het grillige verloop dat deze ziekten bij patiënten vertonen.

weer een laag humane stromale cellen (die verantwoordelijk zijn voor de aangroei van het bot). Voor het orthopedisch onderzoek is dit meteen het eindpunt van het onderzoek.

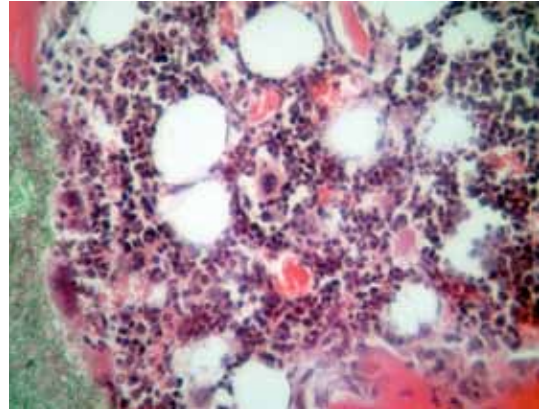
Echter, door als hematoloog te kijken naar de histologische coupes valt het direct op dat in de open structuren in de scaffolds zich een bloedvormend systeem ontwikkelt, waarin alle soorten beenmerg/bloedcellen aanwezig zijn (Afb. 3 en 4). Intussen weten we dat dit komt doordat de humane stromale cellen die zich op het bot in de scaffolds bevinden, hematopoïetische groeifactoren (hematopoïese = bloedcelproductie) gaan produceren. Dit geheel wordt een 'hematopoïetische niche' genoemd en in dit geval met 'humane' kenmerken. De bloedcellen die in eerste instantie geproduceerd worden, zijn echter van muizen origine en zijn afkomstig van in het bloed circulerende (muizen) stamcellen die zich in de humane niche vestigen en vervolgens uitgroeien tot een bloedvormend systeem, vergelijkbaar met de situatie in het beenmerg. Maar dit was wel een duidelijke indicatie dat de gehumaniseerde scaffolds (hu-scaffolds) in principe hematopoïese konden ondersteunen. In de wetenschap dat de tumorcellen van patiënten met de ziekte van Kahler (multipel myeloom) uitermate afhankelijk zijn van een geschikte 'ondersteunende bot-omgeving' oftewel een hematopoïetische niche, werd de veronderstelling geboren dat de hu-scaffolds wel eens heel geschikt zouden kunnen zijn om niet alleen humane normale stamcellen, maar met name ook maligne (= kwaadaardige) leukemie en myeloom stamcellen in te laten groeien.

Resultaten

Vanaf het begin van de experimenten was het duidelijk dat het 'gehumaniseerde' muizenmodel, wetenschappelijk gezien, een groot succes zou kunnen worden. Het inspuiten van normale bloedvormende stamcellen, hetzij in de bloedbaan, hetzij direct in de hu-scaffolds, leidde in een tijdsbestek van enkele maanden tot de uitgroei van meerdere typen bloedcellen in de scaffolds, vergelijkbaar met de productie van bloedcellen in het beenmerg bij de mens. Vervolgens bleek dat de myeloom cellen van Kahler patiënten, zowel na intraveneuze injectie als na injectie rechtstreeks in de hu-scaffolds, uitgroeiden tot duidelijk waarneembare tumoren, die honderden miljoenen cellen kunnen bevatten (Afb. 5 en 6). Dit opende een scala aan mogelijkheden om

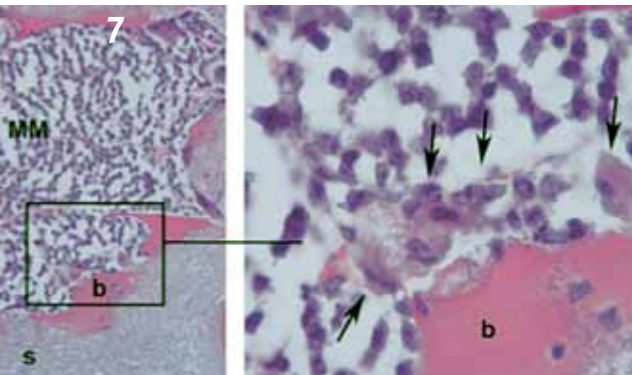


Afbeelding 3. Een histologische coupe van een scaffold die circa 8-10 weken na implantatie uit de muis is verwijderd. (HE kleuring; het scaffold materiaal is grijs, het humane bot is roze van kleur). De open ruimtes zijn gevuld met bloedcellen.



Afbeelding 4. Bij een hogere vergroting is de grote verscheidenheid aan verschillende typen bloed- beenmergcellen goed te zien.

onderzoek te doen aan deze zo moeilijk te behandelen en tot op heden nagenoeg ongeneeslijke ziekte. In de hu-scaffolds werd ook gezien dat er botafbraak plaatsvond op die plaatsen waar de myeloomcellen in contact waren met het bot, iets dat bij Kahlerpatiënten ook wordt waargenomen en wat de oorzaak is van botpijn en botontkalking (osteolyse; Afb. 7), hetgeen bij patiënten in voorkomende gevallen kan leiden tot botbreuken. Doordat deze botafbraak ook in de hu-scaffolds, waarin de myeloomcellen groeien, plaatsvindt, biedt het de mogelijkheid om nieuwe medicijnen, die eventueel osteolyse kunnen remmen, in dit gehumaniseerde muizenmodel te testen.



Afbeelding 5. De onderhuidse tumoren die bij de scaffolds zijn gevormd zijn duidelijk zichtbaar.

Afbeelding 6. Een macro-opname van een onderhuidse tumor, aan de rechterkant is het witte scaffoldmateriaal nog goed zichtbaar.

Afbeelding 7. Een foto van een histologische coupe: daar waar myeloom cellen (MM) contact maken met bot (b) treedt botafbraak (osteolyse) op. De zwarte pijlen wijzen naar osteoclasten, dit zijn een soort macrofaag-achtige cellen die, daartoe aangezet door de myeloomcellen, lokaal bot resorberen. S: scaffold materiaal. »



Bio Services



tem sega

technique · équipement · médical

Temsega Anesthesie en Euthanasie equipment



www.bioservices.nl



Bio Services

Clear H₂O



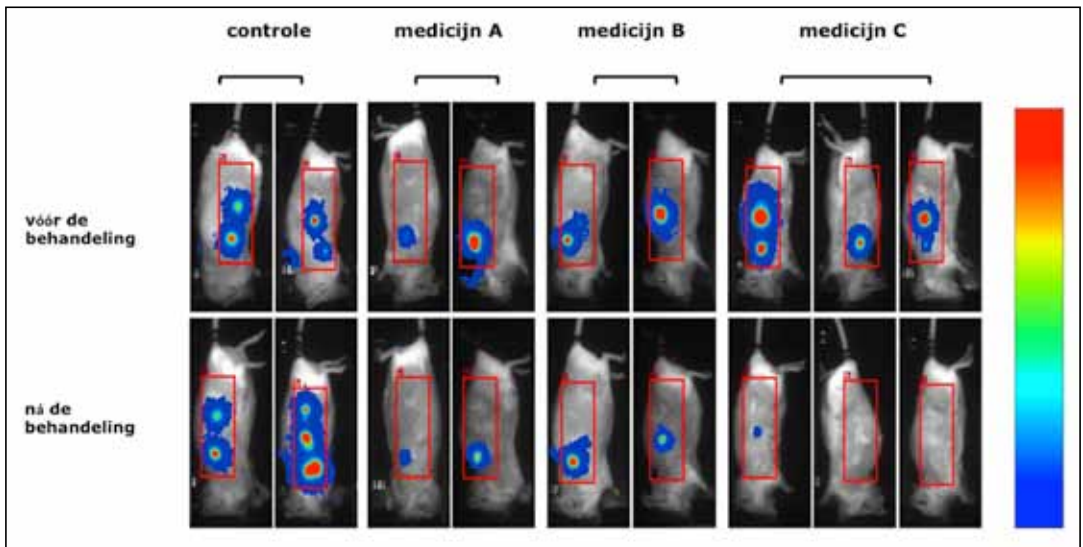
Clear H₂O gels packed sterile inside and out!



- HydroGel™
- DietGel™
- MediGel™

www.bioservices.nl

Een tweede, niet minder belangrijke component in het gehumaniseerde scaffold model is het gebruik van bioluminescentie imaging om zowel de groei als de effecten van de toegepaste therapie kwantitatief te kunnen volgen. Deze methode is gebaseerd op het genetisch markeren van de tumorcellen met het van de vuurvlieg afkomstige gen dat codeert voor luciferase. Als dieren waarin zich tumoren bevinden die luciferase tot expressie brengen - onder narcose - ingespoten worden met het substraat luciferine, dan wordt dit omgezet door het luciferase waarbij fotonen vrijkomen (zoals een vuurvliegje licht gaat geven in het donker). Door gebruik te maken van speciale imaging apparatuur (Biospace®) is zowel de locatie als de grootte van een tumor kwantitatief te bepalen. Groei en afname van de myeloom tumoren is niet alleen goed te volgen, maar de methode is zeer gevoelig en is bijvoorbeeld ook geschikt om het uitzaaien van een tumor waar te nemen (ook hele kleine tumoren kunnen gedetecteerd en gemeten worden). Overigens zaaient de myeloomcellen zich in het algemeen alleen uit naar andere hu-scaffolds en groeien ze vrijwel niet in het muizenbeenmerg of andere organen. De bioluminescentie imaging methode is ook zeer geschikt om bijvoorbeeld waar te nemen dat de cellen van patiënt X ook in de muis resistent zijn voor dezelfde chemotherapie waar de patiënt resistent voor was geworden en zeer gevoelig voor het middel dat bij de patiënten ook effectief bleek (Afb. 8).



Afbeelding 8

In het hu-scaffold model kan patiënt specifieke chemotherapie resistentie onderzocht worden. Dit zijn de opnamen die het speciale bioluminescentie imaging apparaat oplevert. Deze figuur toont hu-scaffold muizen waarin multipel myeloom tumorcellen groeien die afkomstig zijn van een patiënt die niet meer op de toegediende chemotherapie reageerde. De intensiteit van de kleur geeft de grootte van de tumoren aan, blauw is kleine tumor, rood betekent grote tumor. De muizen werden behandeld met dezelfde therapie die de patiënt kreeg toegediend. De patiënt was resistent voor medicijn A en B maar reageerde later zeer goed op medicijn C. Dat bleek in de hu-scaffold muizen identiek te zijn. De afname na toediening van medicijn A was minimaal, medicijn B nog minder, maar na toediening van medicijn C waren 2 van de 3 muizen tumorvrij. Het hu-scaffold model biedt dus mogelijkheden om de aard van de resistentie te onderzoeken en nieuwe middelen, waar de patiënt mogelijk wel op zal reageren, uit te testen.

Wetenschappelijk belang

De mogelijkheid om patiënten-myeloomcellen in een controleerbare en manipuleerbare humane botomgeving in muizen te laten groeien, betekent dat allerlei processen die daar een rol bij spelen, onderzocht kunnen worden, zoals bijvoorbeeld (i) de invloed van lokaal geproduceerde groeifactoren die de groei van de tumorcellen sturen, (ii) de 'genetische evolutie' van de tumorcellen, (iii) het testen van nieuwe medicijnen, (iv) het testen van nieuwe vormen van »



immuuntherapie, enzovoort. In het afgelopen jaar is bovendien duidelijk geworden dat de gehumaniseerde scaffolds niet alleen multipel myeloom tumorcelgroei ondersteunen, maar eveneens de groei van verscheidende andere hematologische tumoren (zowel van volwassenen als van kinderen afkomstig) en intussen is ook gebleken dat cellen van solide tumoren, zoals borst en prostaatkankercellen – die bij patiënten bij voorkeur naar het bot uitzaaien – in deze gehumaniseerde scaffolds kunnen groeien. Kortom, de aanwezigheid van humaan bot met daarop een hematopoiese-ondersteunde (stromale) celstructuur maakt het mogelijk om vele vormen van normale en abnormale hematopoiese te onderzoeken.

Recent is door het opnemen van endotheel stamcellen in het ‘productieproces’ de vorming van humane bloedvaten aan het systeem toegevoegd, waarmee het scaffold model nog verder is gehumaniseerd. Om deze redenen is het begrijpelijk dat dit gehumaniseerde model momenteel veel aandacht trekt, aangezien het ongekende mogelijkheden biedt om allerlei processen te bestuderen waarbij een specifieke interactie tussen de humane micro-omgeving en de humane tumor(stam)cellen een belangrijk rol spelen. Dit is het geval bij het ontstaan en verder uitgroei- en van leukemie maar ook bij het ontwikkelen van nieuwe medicijnen voor de behandeling van multipel myeloom en leukemie patiënten. Eens te meer heeft dit onderzoek aangetoond dat de micro-omgeving een zeer bepalende rol speelt bij het ontstaan van verminderde gevoeligheid voor medicijnen.

Maatschappelijk belang

Het maatschappelijk belang van dit onderzoek is vooral gelegen in de mogelijkheid die het hu-scaffold model biedt om meer op de leukemie/myeloom patiënt gerichte vraagstellingen te bestuderen. Dat kan zijn, het testen van nieuw ontwikkelde chemotherapie of immunotherapie. Ook bij resistentie tegen bestaande middelen, die in het model vaak even resistent blijken als bij de patiënten (Afb. 8), kan het model belangrijk zijn om het mechanisme daarachter te bestuderen, en om nieuwe middelen in te testen die de resistentie mogelijk doorbreken. De verwachting is dat het gehumaniseerde scaffold model in belangrijke mate zal bijdragen aan het bepalen van de optimale condities om deze therapieën met succes bij patiënten te kunnen toepassen.

Afweging ongerief versus belang

Bij het gebruik van proefdieren voor biomedisch onderzoek speelt de afweging van ongerief voor het proefdier tegen het wetenschappelijk en maatschappelijk belang een belangrijke rol. Het gehumaniseerde scaffold model biedt niet eerder bereikte mogelijkheden om tumorcellen van patiënten rechtstreeks in een relevante gehumaniseerde omgeving te bestuderen, zowel op groei als op de reactie op chemo-immunotherapie. Dit is van groot belang omdat inmiddels

duidelijk is geworden dat ook de micro-omgeving waarin de tumorcellen zich bevinden invloed heeft op het ontstaan van resistentie voor de gegeven behandeling en dat het dus niet alleen veranderingen in de tumorcellen zijn die de resistentie veroorzaken.

De groei van de tumoren in de scaffolds onder de huid veroorzaakt veel minder ongerief dan wanneer de tumorgroei in de interne organen c.q. het beenmerg van de muizen zou plaatsvinden. Ook het gebruik van bioluminescentie imaging (onder narcose) om de groei en response van de tumoren te volgen, is niet bijzonder belastend. Het voornaamste ongerief zal worden veroorzaakt door de (systemische) bijwerkingen van de toegepaste experimentele therapie. Vooral met cytostatica is dat een belangrijk aspect. De anti-tumor middelen die momenteel ontwikkeld worden, zijn steeds meer specifiek gericht op de 'afwijkende biochemie' van de tumorcel of in geval van immunotherapie, meer gericht op specifieke kenmerken op het celmembran van de tumorcellen aanwezig zijn. Maar het grote belang van het hu-scaffold model is, dat het ingezet kan worden voor bovengenoemde doeleinden bij onderzoek naar ernstige ziektebeelden zoals acute leukemie en multipel myeloom. Deze ziekten treffen vele honderden patiënten (400 nieuwe leukemie patiënten en 750 nieuwe multipel myeloom patiënten per jaar in Nederland) waarvoor tot op heden slechts in beperkte mate (40% bij leukemie), of nauwelijks genezing mogelijk is, zoals bij multipel myeloom.

Het gehumaniseerde scaffoldmodel zal naar verwachting de komende jaren een belangrijke rol gaan spelen bij het verkrijgen van een beter inzicht in de biochemische processen die de groei van tumoren sturen en eveneens bij de zoektocht naar nieuwe en meer effectieve middelen voor de behandeling daarvan.

Literatuur

Groen RWJ, Noort WA, Raymakers RA et al. (2012). *Reconstructing the human hematopoietic niche in immunodeficient mice: opportunities for studying primary multiple myeloma*. Blood 120(3): e9–e16.

