

University of Groningen

## Regeneration of irradiated salivary glands by stem cell therapy

Lombaert, Isabelle Madeleine Armand

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2008

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Lombaert, I. M. A. (2008). *Regeneration of irradiated salivary glands by stem cell therapy*. s.n.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## DUTCH SUMMARY



Per jaar wordt er wereldwijd bij ongeveer 500.000 patiënten een hoofd- en/of halstumor gediagnosticeerd. Deze patiënten worden voornamelijk behandeld met radiotherapie, eventueel in combinatie met chirurgie en/of chemotherapie. De hoge stralingsdosis, die nodig is om het kwaadaardige weefsel te vernietigen, kan echter ook normale weefsels gelegen in het stralingsveld beschadigen. In het hoofd- en halsgebied zijn de speekselklieren één van de meest stralingsgevoelige organen en speekselklier functieverlies kan al na de eerste weken van radiotherapie optreden. Uiteindelijk blijft bij meer dan 64% van de patiënten het verlies in speekselproductie permanent aanwezig wat kan leiden tot xerostomie (= droge mond syndroom). Dit resulteert in een verhoogde kans op mondinfecties en tandbederf, verminderde smaak- en geurvoeligheid en belemmering in het spreken en kauwen van voedsel. Deze fysieke klachten beïnvloeden daarnaast op negatieve wijze het psychologisch/sociale gedrag van de patiënten. Ondanks het feit dat xerostomie niet levensbedreigend is wordt het als één van de meest ernstige stralingsgeïnduceerde neveneffecten bij hoofd- en/of halsbestralingen beschouwd. De grote impact die het heeft op de kwaliteit van leven maakt de preventie en behandeling tot een belangrijk onderwerp bij hoofd- en halstumor patiënten.

Het zijn de “primitieve” cellen (stamcellen) in de speekselklier die zorgen voor continue celaanvoer. Echter, vanwege de door de bestraling geïnduceerde DNA schade zijn deze cellen niet meer in staat meer om nakomelingen te produceren waardoor er na enige tijd een tekort aan functionele cellen ontstaat. Dit leidt tot een onvoldoende aanvulling van nieuwe acinaire cellen wat een permanent verlies van speekselproductie tot gevolg heeft. Stamceltherapie voor de regeneratie (herstel) van beschadigde speekselklieren zou daarom een oplossing kunnen bieden ter preventie van xerostomie. Verhoging van het aantal onbeschadigde stamcellen in een bestraalde speekselklier zou kunnen leiden tot een herstel van de aanmaak van speekselproducerende acinaire cellen en een verhoogde speekselproductie.

Stamcellen uit het beenmerg kunnen een rol spelen bij het herstel van verscheidene beschadigde weefsels zoals hersenen, lever, spieren, en hart en kunnen dit wellicht ook doen bij bestraalde speekselklieren. Specifieke cytokinen, eiwitten geproduceerd door cellen die signaaltransductie induceren door te binden op celmembraan receptoren, kunnen stamcellen uit het beenmerg naar de bloedbaan mobiliseren. Toediening van het cytokine Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) leidde in het door ons onderzochte muismodel tot een sterke verhoging van beenmerg(stam)cellen in de bestraalde speekselklier en leidde tevens tot een verbetering in speekselsecretie.

Deze verhoging in speekselproductie was het gevolg van een stijging van het aantal speekseleiwit producerende acinaire cellen. Het bleek echter dat beenmergstamcellen, op hun best slechts in zeer kleine mate (< 1%) in staat waren te veranderen in speekselkliercellen (trans-differentiëren). Daarom werd door ons aangenomen dat de uit beenmergafkomstige cellen groeistimulerende, differentiatie-stimulerende en ontstekingsremmende factoren produceren waardoor endogene speekselklierstamcellen, die de bestraling overleven, gestimuleerd worden om te delen en acinaire cellen te vormen. Dit leidt vervolgens tot regeneratie van de speekselklieren en verhoogde speekselsecretie.

Om deze regeneratie vanuit de endogene speekselklierstamcellen een extra stimulans te geven werd een mobilisatie protocol ontwikkeld dat moest leiden tot een verhoging van het aantal beenmerg(stam)cellen in de beschadigde speekselklier. Een combinatie van cytokinen, te weten Flt-3L, Stem Cell Factor (SCF) en G-CSF (kortweg F/S/G genoemd), leidde inderdaad tot grotere aantallen beenmergstamcellen en beenmergprogenitorcellen (minder primitief dan stamcellen) in de bestraalde speekselklier dan met G-CSF alleen. Desondanks werden niet meer acinaire cellen waargenomen en was er geen verdere verbetering van de restfunctie van de klier na bestraling dan na een voorbehandeling met G-CSF alleen. Deze observatie suggereerde dat de stralingsoverlevende speekselklierstamcellen al maximaal werden gestimuleerd met een G-CSF geïnduceerde beenmerg(stam)cel mobilisatie. Voor een optimaal herstel van de speekselklier zijn er dus meer weefselspecifieke stamcellen nodig.

Om speekselklier stamcellen te isoleren werd een *in vitro* kweekstelsel ontwikkeld waarin, analoog aan verschillende andere weefsels (b.v. borstklierweefsel), sferen (klompjes cellen) werden gevormd. In dit systeem bleken enkel een beperkt aantal cellen te overleven en uit te groeien tot sferen terwijl gedifferentieerde celtypes verdwenen. Overlevende cellen brachten eiwitten tot expressie die betrokken zijn bij stamcel specifieke signaaltransducties. De cellen in de sferen bleken bovendien in staat om *in vitro* in een 3 dimensionale omgeving zowel duct (speekseltransporterende cellen) als acinaire cellen te genereren. Dit is in overeenstemming met de eigenschap van stamcellen die in staat zijn om gedifferentieerde cellen (acini) te vormen en zichzelf in stand te houden (duct cellen). *In vivo* transplantatie van cellen uit de *in vitro* gevormde sferen in bestraalde speekselklieren resulteerde in zowel een morfologische als functionele verbetering. Nieuwe acinaire cellen werden gevormd vanuit de getransplanteerde cellen en meer speeksel werd geproduceerd dan in de ongetransplanteerde groep.

Omdat deze celpopulatie, verkregen via de sferen, heterogeen was, werd geprobeerd om een meer zuivere stamcelpopulatie hieruit te isoleren. Op basis van de eiwitexpressie van c-Kit, een stamcelreceptor exclusief aanwezig op duct cellen, werden potentiële stamcellen uit de sferen geïsoleerd. Transplantatie van slechts 300-1.000 van deze cellen resulteerde in een speekselklierherstel in 81% van de dieren, waarvan bij sommigen zelfs normale speekselproductiewaarden werden behaald. Dit lukte slechts tijdelijk of helemaal niet met (10.000-90.000) c-kit negatieve getransplanteerde cellen. Hierna werden c-kit<sup>+</sup> cellen volgens dezelfde procedure uit de primaire, succesvol getransplanteerde, speekselklieren gehaald en opnieuw getransplanteerd (met slechts 100 cellen per klier) in een secundaire ontvanger. Ook bij deze seriële transplantaties werd speekselklierherstel geobserveerd, wat een sterke aanwijzing is voor het idee dat c-Kit<sup>+</sup> cellen in staat zijn tot zelfvernieuwing en dus stamcelcapaciteiten hebben.

Ook humane speekselklieren bleken cellen te bevatten die sferen konden vormen. Isolatie van c-Kit<sup>+</sup> cellen uit deze sferen en hun transplantatie in immunodeficiente muizen zal opheldering moeten geven over de potentie die deze cellen hebben voor klinische toepassingen. Dit proefschrift behelst de start van dit humaan speekselklier stamcelonderzoek dat mogelijk leidt tot een eerste klinische studie van stamceltransplantatie ter vermindering van de stralingsschade aan de speekselklier bij hoofd- en halstumor patiënten.

Dat het verhogen van de aantallen speekselklierstamcellen een uitweg biedt tot het verminderen van speekselverlies bleek verder uit ons KGF (Keratinocyte Groei Factor) onderzoek. KGF leidde tot de vermenigvuldiging van speekselklier stam- en progenitorcellen *in vivo*. Door deze stimulatie bleven meer stam- en progenitorcellen over na bestraling. Als gevolg hiervan was de regeneratie na bestraling beter en waren er meer functionele acinaire cellen, waardoor de speekselproducties nagenoeg normaal waren. Het klinische gebruik van KGF wordt momenteel onderzocht in een Fase III trial voor de behandeling van stralingsgeïnduceerde orale mucositis (mondinfecties). Indien deze trial positief wordt bevonden en het blijkt dat KGF de tumor niet beschermt of andere negatieve bijwerkingen heeft, biedt KGF ook een mogelijke uitweg tot het verminderen van speekselschade na bestraling.

Een verbetering in speekselproductie voor patiënten die lijden aan stralingsgeïnduceerde vermindering van speekselproductie kan een beduidende verbetering betekenen in hun kwaliteit van leven na bestraling. Het isoleren van stamcellen uit de speekselklier, verkregen uit de patiënt voorafgaande aan de radiotherapeutische behandeling van hoofd- en/of halstumoren en het zorgvuldig terug transplanteren van deze cellen na bestraling kan een mogelijke therapie vormen.

Anderzijds kan het verhogen van deze stamcel aantallen d.m.v. groeifactoren een uitweg bieden. Dit concept van stamceltherapie kan leiden tot een geheel nieuwe benadering om stralingsbeschadigd weefsel te herstellen die bijgevolg niet enkel gelimiteerd hoeft te zijn tot de speekselklier.