



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Biology of cytokine-induced hematopoietic stem and progenitor cell mobilization

Kruijf, E.J.F.M. de

Citation

Kruijf, E. J. F. M. de. (2019, November 21). *Biology of cytokine-induced hematopoietic stem and progenitor cell mobilization*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/80691>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/80691>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/80691> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Kruijf, E.J.F.M. de

Title: Biology of cytokine-induced hematopoietic stem and progenitor cell mobilization

Issue Date: 2019-11-21

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Bij mensen en bij gewervelde dieren worden bloedcellen gemaakt in het beenmerg. Alle bloedcellen stammen af van zogeheten hematopoietische stamcellen (HSC), die aan de top van een hiërarchie van beenmerg- en bloedcellen staan. Deze stamcellen brengen weer voorlopercellen (HPC) voort, die op hun beurt differentiëren in bloedcellen die een specifieke functie hebben, zoals B-cellen, T-cellen, monocytën en granulocyten. Deze cellen hebben zelf de eigenschap om zich te delen verloren. Hematopoietische stam- en voorlopercellen (HSPC) verblijven in het BM in specifieke niches, waar ze onderdeel zijn van een complex micromilieu, bestaande uit verschillende soorten bloed-, beenmerg- en bindweefselcellen. In **hoofdstuk 1** wordt dit in detail beschreven.

In de klinische praktijk worden HSPC getransplanteerd van een donor naar een ontvanger, met als doel het behandelen van zowel kwaadaardige als goedaardige ziekten. HSPC kunnen op twee manieren van een donor worden verkregen: direct vanuit het beenmerg via een beenmergpunctie of via het bloed, volgend op migratie van HSPC vanuit het beenmerg naar het bloed. Dit proces van het bewegen van de HSPC van het beenmerg naar het bloed wordt "mobilisatie" genoemd. HSPC die verkregen zijn via mobilisatie worden tegenwoordig veel vaker gebruikt dan HSPC die via beenmergpunctie zijn verkregen, zowel voor autologe als voor allogene transplantatie. De reden hiervoor is dat er verschillende voordelen zijn aan het mobiliseren van HSPC: er is geen invasieve beenmergpunctie voor nodig, er kunnen meer HSPC worden verkregen per procedure en bij een patiënt die de cellen ontvangt treedt sneller herstel van de beenmergfunctie op.

Onder normale omstandigheden bevat het bloed slecht een klein aantal HSPC. De HSPC die zich in het beenmerg bevinden kunnen door een verschillend aantal stoffen worden gemobiliseerd naar het bloed, zoals cytokines, chemokines, bepaalde kleine moleculen of door chemotherapie. Toediening van een specifieke groeifactor, G-CSF (granulocyten-kolonie-stimulerende factor) is de standaardbehandeling voor het mobiliseren van stamcellen bij mensen. Echter, hoe dit precies in zijn werk gaat, is tot nu toe niet volledig bekend. Dat is een probleem, omdat (afhankelijk van bepaalde donorkarakteristieken) tot 40% van de stamceldonoren niet mobiliseert na toediening van G-CSF. Daarom is het van belang om de gebeurtenissen die leiden tot HSPC mobilisatie te begrijpen. Zo kunnen nieuwe strategieën worden ontworpen om het mobilisatieproces te optimaliseren.

Dit proefschrift richt zich op de mechanismen die ten grondslag liggen aan stamcelmobilisatie. Hierbij worden zowel muismodellen als waarnemingen bij patiënten en gezonde donoren gedaan.

KINETIEK VAN HSC EN HPC MOBILISATIE

In hoofdstuk 2 wordt het gebruik van het cytokine Flt3-ligand (FL) beschreven waarmee het mogelijk is om de kinetiek van de mobilisatie van HSC en HPC te bestuderen. FL induceert langzame mobilisatie omdat het 5 tot 10 dagen duurt om HSPC van het beenmerg naar het bloed te mobiliseren. Bij G-CSF duurt het 3-5 dagen voordat het gewenst effect bereikt wordt. Dit langzame mobilisatie proces geeft de gelegenheid om HSPC mobilisatie in detail te bestuderen. HPC zijn in staat om kortdurend het beenmerg te repopuleren. De hoeveelheid HPC in het bloed kan worden bepaald doordat zij in kweek kolonievormende units – granulocyten/macrofagen (CFU-GM) vormen. Als FL intraperitoneaal wordt toegediend bij muizen gedurende 3-10 dagen neemt het aantal CFU-GM significant toe vanaf dag 3, passend bij HPC mobilisatie. HSC hebben de capaciteit om te zorgen voor langdurige repopulatie van het beenmerg. Zij kunnen worden gemeten met behulp van een "cobblestone-area-forming cell" (CAFC) assay, indien deze wordt uitgelezen op dag 28 en op dag 35 na start van de kweek. CAFC dag 28 en dag 35 was significant hoger na toediening van FL gedurende 10 dagen dan na toediening gedurende 5 dagen. Deze resultaten werden bevestigd door bestralingsexperimenten bij muizen (middels een radioprotectie assay). Na transplantatie van bloedcellen die verkregen waren na 5 dagen FL werd geen radioprotectie gezien. Daarentegen beschermden bloedcellen verkregen bij muizen die gedurende 10 dagen met FL waren behandeld de muizen volledig. In deze groep muizen werd > 90% chimerisme gezien. Dit betekent dat HPC en HSC een verschillende kinetiek hebben na toediening van FL. Hierbij is er preferentiële mobilisatie van HPC op dag 5, gevolgd door HSC mobilisatie op dag 10. Flt3 is overigens niet aanwezig op HSC, zodat de mobilisatie van HSC door FL alleen door een indirect mechanisme kan zijn veroorzaakt. Een mogelijke verklaring is onderbreking van de CXCL12/CXCR4 as of toename van neutrofiële granulocyten in het beenmerg, waarbij proteases vrijkomen die HSC mobilisatie in gang kunnen zetten. Als FL gegeven werd in combinatie met IL-8 werd toegenomen mobilisatie van HSC en HPC op dag 3 en dag 5 na toediening gezien, vergeleken met FL of IL-8 alleen. Ook werd verbeterde overleving gezien in een radioprotectie assay indien FL gedurende 5 dagen gecombineerd werd met IL-8. Dit komt mogelijk door een hoger aantal gemobiliseerde HPC, die zorgen voor overleving in de vroege fase na stamceltransplantatie. Hierdoor wordt het mogelijk dat HSC zich in het beenmerg nestelen en langdurige overleving van de ontvangermuizen mogelijk maakt.

HERHAALDE G-CSF TOEDIENING

Na toediening van G-CSF nemen de HSPC in het bloed geleidelijk toe. De gemobiliseerde HSPC bereiken een plateau tussen dag 5 en 10 na G-CSF toediening, waarna zij weer afnemen. Bij muizen waarbij op experimentele

wijze een gezamenlijke bloedsomloop bestaat, is aangetoond dat HSPC die gemobiliseerd zijn, ook weer kunnen terugkeren naar het beenmerg. Echter, een deel van de gemobiliseerde HSPC keert mogelijk niet terug naar hun beenmerg niche en gaat dood. Als dat voor een groot deel van de gemobiliseerde HSPC zou gelden, dan zou herhaalde G-CSF toediening kunnen leiden tot uitputting van de stamcelvoorraad en uiteindelijk tot beenmergfalen. In **hoofdstuk 3** worden experimenten beschreven, waarbij G-CSF in herhaalde cycli van 5 dagen werd toegediend in een tweewekelijks schema. In totaal werden maximaal 12 cycli van 5 dagen G-CSF toegediend. Bij toediening van recombinant humaan G-CSF werd verminderde HSPC mobilisatie vanaf cyclus 4 gezien. Na 12 cycli G-CSF werd in geheel geen mobilisatie meer waargenomen. In het beenmerg werd geen verschil gezien in het aantal CFU-GM en neutrofielen tussen de verschillende cycli. In een aanvullend experiment werd IL-8 toe gediend na de laatste injectie met G-CSF. Hierbij mobiliseerden de HSPC normaal, wat aantoonde dat er geen gestoorde mobilisatiecapaciteit was. Het bleek dat de afname in HSPC mobilisatie veroorzaakt werd door neutraliserende antilichamen gericht tegen recombinant humaan G-CSF. Deze konden worden aangetoond in het plasma van muizen die 2 of meer cycli recombinant humaan G-CSF hadden ontvangen. Dit toont aan dat het toedienen van een humaan cytokine zijn beperkingen kent bij toepassing in een muismodel voor HSPC mobilisatie.

Dat de afname in HSPC mobilisatie door deze antilichamen werd veroorzaakt, werd nog versterkt door de waarneming dat mobilisatie met recombinant muizen-G-CSF geen verminderde mobilisatie liet zien tot en met toediening van 12 cycli. Dit suggereert dat herhaalde toediening van G-CSF niet tot uitputting van de stamcelvoorraad leidt.

PROTEASE REMMING EN HSPC MOBILISATIE BIJ PATIËNTEN EN DONOREN

G-CSF-geïnduceerde HSPC mobilisatie gaat samen met een toename van neutrofielen in beenmerg en bloed. Eerder onderzoek van onze groep toonde aan dat neutrofielen belangrijk zijn bij cytokine-geïnduceerde HSPC mobilisatie. Na toediening van G-CSF worden proteases losgemaakt uit korrels in het cytoplasma van de neutrofiel. Deze proteases zijn onder andere neutrofiel elastase (NE), cathepsine G (CG) en matrix-metalloproteïnase-9 (MMP-9). Tijdens G-CSF mobilisatie neemt de hoeveelheid proteases in het beenmerg toe, waardoor een milieu ontstaat waarbij eiwitten makkelijk geknipt kunnen worden. Hierdoor worden verschillende verbindingen doorgeknipt, zoals VCAM-1/VLA-4 en CXCL12/CXCR4, die HSPC in het beenmerg verankeren. Dit resulteert vervolgens in mobilisatie van HSPC naar het bloed. Onder normale omstandigheden wordt door proteaseremmers voorkomen dat de hoeveelheid actieve proteases te hoog wordt. Proteaseremmers zoals serpina1 (alpha-1-antitrypsin, AAT) en serpina3 (alpha-1-

antichymotrypsin, ACT) kunnen de serine proteases NE en CG, die door neutrofielen worden uitgescheiden, remmen. Bij mensen neemt het niveau van de proteases MMP-9 en NE in het bloedplasma toe na 3 tot 5 dagen G-CSF toediening; dit niveau correleert met de mate van HSPC mobilisatie. In **hoofdstuk 4** wordt beschreven wat de relatie is tussen de hoeveelheid AAT en de HSPC frequentie onder normale omstandigheden en tijdens cytokine-geïnduceerde HSPC mobilisatie. Patiënten met alfa-1-antitrypsine deficiëntie hebben lage bloedspiegels van AAT (10-15% t.o.v. gezonde mensen). Wij hebben de hypothese getoetst dat bij deze patiënten, onder fysiologische omstandigheden, de toegenomen AAT activiteit in het beenmerg zou leiden tot een verhoogd aantal HSPC in het bloed. Door middel van flowcytometrie en HPC kweken kon dit echter niet worden aangetoond. Dit onverwachte resultaat kon niet worden veroorzaakt door een compensatoire toename van andere proteaseremmers, omdat de spiegels van de proteaseremmers alfa-2-macroglobuline en SLPI (secretory leukoproteïnase inhibitor) niet verschilden tussen de patiëntengroep en een groep gezonde vrijwilligers. Dit laat zien dat AAT geen onmisbare proteaseremmer is in de constitutionele circulatie van HSPC bij mensen. In een ander experiment werden gezonde stamceldonoren behandeld met G-CSF gedurende 5 dagen, waarbij het aantal CD45⁺/CD34⁺ cellen (als maat voor HSPC) werd bepaald in het bloed. Gedurende G-CSF mobilisatie namen de AAT spiegels geleidelijk toe, evenredig met het aantal gemobiliseerde CD45⁺/CD34⁺ cellen. De toename van AAT spiegels is waarschijnlijk het gevolg van hoge spiegels van proteases zoals NE, dat gebonden wordt door AAT. Proteases spelen een belangrijke rol bij HSPC mobilisatie. Echter, in studies met muizen die op experimentele wijze een of meerdere proteases missen, wordt wel HSPC mobilisatie gezien door G-CSF. Deze data en de gegevens uit onze studie tonen aan dat er waarschijnlijk zowel protease-afhankelijke als protease-onafhankelijke mechanismen bestaan die, onder invloed van cytokines, leiden tot mobilisatie van HSPC van beenmerg naar bloed.

HSPC MOBILISATIE EN DE BEENMERG NICHE

Recent onderzoek heeft aangetoond dat de beenmergniche bestaat uit hematopoïetische en niet-hematopoïetische cellen, die een belangrijke rol spelen in de mobilisatie van HSPC. Mesenchymale stromale cellen (MSC) zijn niet-hematopoïetisch en hebben de capaciteit om te differentiëren naar botcellen, vetcellen en kraakbeencellen. In het beenmerg vormen MSC een onderdeel van de HSC niches die zich rond verschillende typen bloedvaten bevinden. MSC hebben een belangrijke rol in het HSC micromilieu. Daarnaast spelen zij ook een rol bij het nestelen van de HSC in het beenmerg na een stamceltransplantatie. Dat vormde de aanleiding voor de onderzoeken die in **hoofdstuk 5** zijn beschreven, waarbij wij het effect van de toediening van MSC op het beenmerg hebben bestudeerd.

Wij toonden hierbij aan dat dagelijkse toediening van MSC bij muizen leidt tot toegenomen celcyclus activiteit van de HSC. Daarnaast werd na toediening van MSC ook een significant verlaagd aantal macrofagen gezien, zowel bij macrofagen die langs het endosteum liggen als bij CD169⁺ macrofagen. Factoren zoals *Cxcl12* en *Vcam*, die zorgen dat HSC in het beenmerg blijven, waren significant verlaagd in endosteale cellen. Al deze veranderingen zijn gelijk aan wat gezien wordt in het beenmerg na mobilisatie met G-CSF. Toediening van MSC leidt echter op zichzelf niet tot mobilisatie, maar bij toediening van MSC en G-CSF samen werden meer dan twee keer zoveel gemobiliseerde HSPC gezien. Daarnaast liet gezamenlijke toediening van MSC en G-CSF, vergeleken met G-CSF alleen, ook een afname zien in *Cxcl12*, *Vcam* en *Scf* in endosteale cellen. Met behulp van bioluminescentie werd aangetoond dat bij muizen waarbij MSC in een ader ingespoten werd, de MSC vastliepen in de longen en niet terugkeerden naar het beenmerg. Wanneer de kweekvloeistof van MSC werd toegediend samen met G-CSF werd vergelijkbare mobilisatie van HSPC gezien. Hieruit leidden wij af dat MSC hun effect op de HSC niche waarschijnlijk uitoefenen door middel van een oplosbare stof. Omdat bekend is dat MSC kleine blaasjes kunnen uitscheiden (extracellulaire vesikels, EV), hebben wij onderzocht of het deze EV waren, die via de kweekvloeistof van de MSC, G-CSF geïnduceerde HSPC mobilisatie versterkten. Het bleek inderdaad dat toediening van uit MSC verkregen EV dezelfde effecten liet zien als wanneer alleen MSC toegediend werden: toegenomen HSPC mobilisatie bij combinatie met G-CSF gedurende 3 dagen, toegenomen celcyclus activiteit van de HSPC en een afname van de expressie van *Cxcl12*, *Vcam* en *Scf*. Deze data laten zien dat MSC, via de uitscheiding van EV, een situatie in het beenmerg creëren waarbij factoren, die de stamcellen in het beenmerg verankeren, verlaagd zijn en de HSPC zich in verhoogde celcyclus activiteit bevinden. Deze situatie leidt bij toediening van G-CSF tot meer dan een verdubbeling van het aantal gemobiliseerde HSPC. Verder onderzoek is nodig om aan te tonen welke factoren die zich in de EV bevinden, verantwoordelijk zijn voor deze waarnemingen.

Niet alleen MSC en macrofagen, maar ook andere bindweefsel - en hematopoietische cellen, zoals rode bloedcellen, vaatcellen en cellen van het sympatische zenuwstelsel vormen de HSC niche in het beenmerg. De complexe interacties tussen HSPC en deze celpopulaties worden beschreven in **hoofdstuk 6**. Een uitgebreid arsenaal aan cytokines, chemokines en kleine moleculen is betrokken bij hematopoiese onder fysiologische omstandigheden en bij HSPC mobilisatie.

Enkele van deze stoffen, zoals G-CSF, spelen een belangrijke rol bij de toepassing van HSPC mobilisatie in de klinische praktijk. De toepassing van deze stoffen wordt beschreven in dit hoofdstuk.

Er zijn grote stappen gezet in het ophelderen van de complexe mechanismen die ten grondslag liggen aan HSPC mobilisatie. Er is echter nog steeds behoefte aan innovatieve middelen en behandelingen die optimale mobilisatie van HSPC mogelijk maken. Verder onderzoek hiernaar zal hopelijk leiden tot betere, veiliger en meer efficiënte mobilisatiestrategieën.