



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Stromal cells in inflammatory bowel disease : perspectives of local mesenchymal stromal cell therapy**

Barnhoorn, M.C.

### **Citation**

Barnhoorn, M. C. (2020, May 7). *Stromal cells in inflammatory bowel disease : perspectives of local mesenchymal stromal cell therapy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/136912>

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/1887/136912>

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

Cover Page



Universiteit Leiden

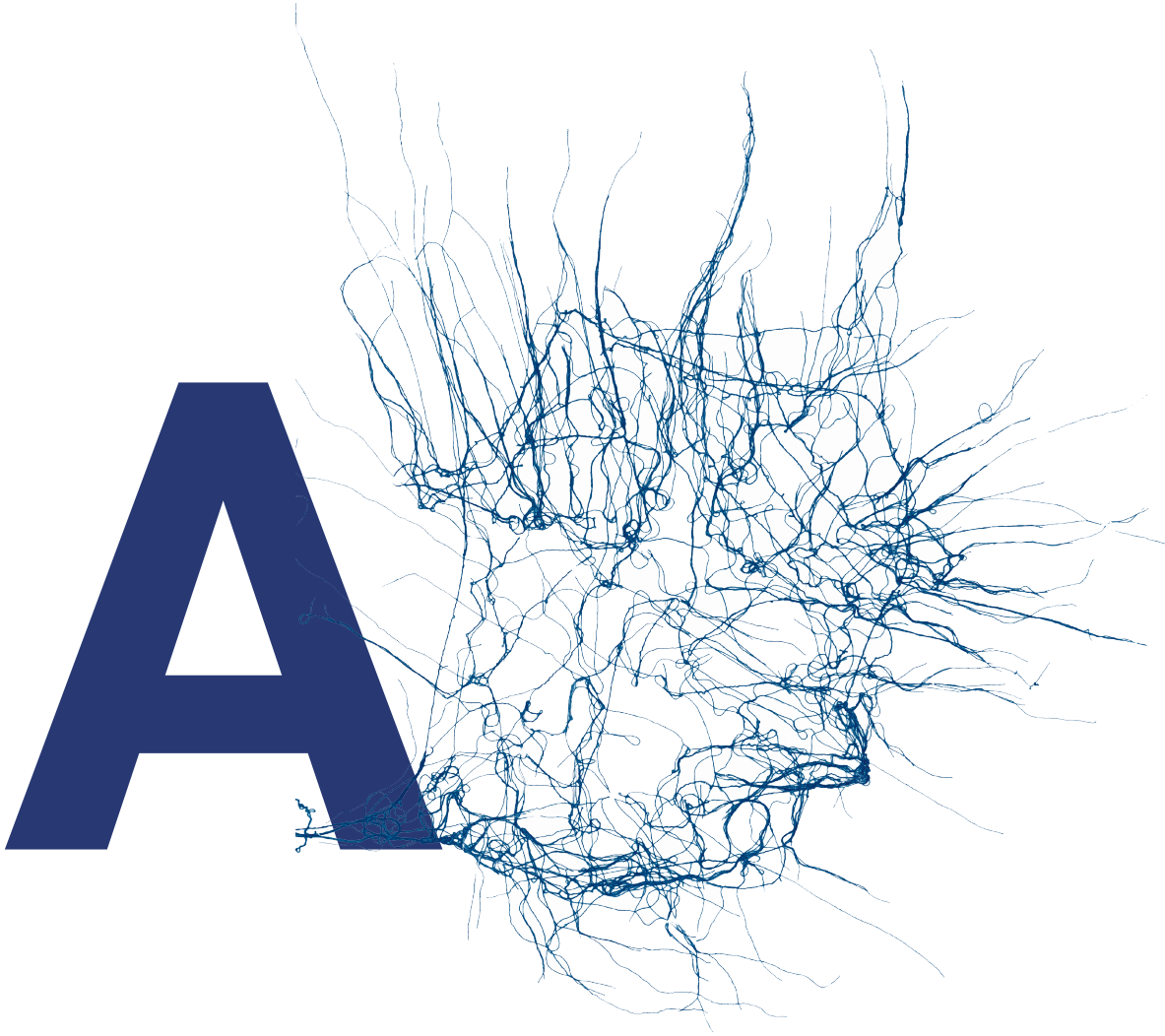


The handle <http://hdl.handle.net/1887/136912> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Barnhoorn, M.C.

**Title:** Stromal cells in inflammatory bowel disease : perspectives of local mesenchymal stromal cell therapy

**Issue Date:** 2020-05-07



## APPENDIX

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Inflammatoire darmziekten (Inflammatory Bowel Diseases, IBD) zijn een chronische ziekte, gekenmerkt door ontstekingen in de darmen. In Nederland zijn er ongeveer 87.000 mensen met IBD. De meeste patiënten worden gediagnosticeerd met de ziekte rond hun 20<sup>ste</sup> tot 30<sup>ste</sup> levensjaar, waardoor de ziekte extra grote gevolgen heeft voor zowel het persoonlijke als professionele leven van mensen. Er zijn twee ziekten die behoren tot IBD: de ziekte van Crohn en colitis ulcerosa. Bij de ziekte van Crohn is er sprake van een ontsteking door de darmwand heen (transmuraal) die in het gehele darmsyteem, van mond tot anus, kan voorkomen, terwijl bij colitis ulcerosa de ontsteking beperkt is tot het oppervlakte van de darm en enkel in de dikke darm, het colon, voorkomt. De ontstaanswijze van IBD is niet volledig opgehelderd, maar zowel genetische gevoeligheid, een verstoorde afweer als een verstoring in de samenstelling van de micro-organismen in de darm lijken een rol te spelen. Een veel voorkomende en zeer lastig te behandelen complicatie van de ziekte van Crohn zijn perianale fistels, langwerpige zweren door de darmwand, die meestal het rectum verbinden met de huid om de anus. Ook de ontstaanswijze van deze perianale fistels is niet opgehelderd, maar naast ontsteking lijkt ook 'epithelial-to-mesenchymal transition' verantwoordelijk voor het ontstaan. In dit proces veranderen epitheliale cellen die de oppervlakte van de darm bekleden in mesenchymale (bindweefsel) cellen met migrerende en penetrerende eigenschappen.

De behandeling van IBD bestaat uit, veelal levenslange, therapieën waarbij functies van het immuunsysteem worden geremd of geblokkeerd. Er wordt bijvoorbeeld gebruik gemaakt van prednison, thiopurines, maar ook van meer selectieve blokkers van het immuunsysteem, zoals anti-TNF- $\alpha$ , anti- $\alpha$ 4 $\beta$ 7-integrin of anti-p40 therapie. Het komt regelmatig voor dat medicatie niet of onvoldoende aanslaat en ontstoken of vernauwde (stenotische) delen van de darm chirurgisch verwijderd moeten worden. Ook voor de behandeling van perianale fistels worden zowel medicamenteuze als chirurgische behandelingen gebruikt. Helaas blijkt maar 37% van de patiënten met complexe perianale fistels over een periode van 10 jaar een gesloten fistel te hebben<sup>1</sup>. Het mag duidelijk zijn dat er nog steeds behoefte is aan nieuwe behandelingen voor zowel perianale fistels als luminale ziekte, die is beperkt tot de darmwand, in het kader van IBD. Mesenchymale stromale cellen (MSCs) zijn een voorbeeld van zo'n nieuwe behandeling voor IBD, vanwege hun afweer-onderdrukkende en weefselherstellende eigenschappen. MSCs zijn stromale (weefselondersteunende bindweefselachtige) cellen die *in vitro* op plastic groeien, bepaalde oppervlakte kenmerk-moleculen bezitten (CD73, CD90, CD105) en daarnaast *in vitro* kunnen differentiëren naar bot- en vetcellen, zoals osteoblasten, adipocyten en chondrocyten<sup>2</sup>. In de meeste gevallen worden ze uit het beenmerg of uit vetweefsel geïsoleerd voor klinische toepassingen. Een gerandomiseerde gecontroleerde interventie-studie vanuit onze onderzoeksgroep liet zien

dat allogene MSCs, verkregen uit het beenmerg van gezonde donoren, in staat zijn om tot 86% van de moeilijk behandelbare (refractaire) perianale fistels te genezen<sup>3</sup>.

In deze thesis worden diverse onderzoeken naar de rol van stromale cellen in IBD beschreven, met daarbij speciale aandacht voor de therapeutische eigenschappen van lokale MSC-therapie. Na de introductie van het hele onderzoek in **Hoofdstuk 1**, wordt in **Hoofdstuk 2** een overzicht gegeven van de huidige literatuur aangaande de rol van stromale cellen in het ziektebeloop (pathogenese) van IBD. In een gezonde darm spelen stromale cellen een belangrijke rol in de epitheliale homeostase, waarbij ze via onder andere de moleculaire Wnt en bone morphogenetic protein routes darm-stamcel functie en diens differentiatie naar epitheelcellen reguleren. Daarnaast spelen stromale cellen in de gezonde darm ook een rol bij het voorkomen van auto-immuniteit door immuuncel-regulatie. De afgelopen twee jaar is er veel nieuwe kennis bijgekomen aangaande de rol van stromale cellen in IBD, met name door single-cell RNA sequencing en cytometry by time-of-flight (CyTOF) van darmcellen van IBD patiënten<sup>4-6</sup>. Hierdoor is allereerst het besef gekomen dat er verschillende stromale celpopulaties in de darm bestaan, die daarnaast verschillende functies lijken uit te oefenen in de ontstoken darm. Een specifieke populatie stromale cellen met een hoge expressie van ontsteking-geassocieerde genen expandeert in de darm van IBD patiënten. Deze populatie wordt ook geassocieerd met het niet reageren op anti-TNF-therapie, de belangrijkste en meest effectieve behandeling op dit moment<sup>6</sup>. Hierop voortbordurend wordt in **Hoofdstuk 3** het onderzoek naar de immunoregulatorische rol van fibroblasten, een subtype stromale cel, afkomstig uit het fistelkanaal van patiënten met de ziekte van Crohn, beschreven. In vergelijking met fibroblasten afkomstig uit het colon, lijken fistel fibroblasten minder inflammatoire merkstoffen, zoals CXCL-1 en IL-6, tot expressie te brengen. Interessant zijn de correlaties die in dit onderzoek werden gevonden in fistelmateriaal tussen specifieke profielen van fibroblasten (PD-L1<sup>low</sup>PD-L2<sup>low</sup>IL-6<sup>high</sup>) en de hoeveelheid regulatorische T cellen (FOXP3<sup>pos</sup>). Dit zou kunnen wijzen op een directe relatie tussen fibroblasten en immuuncellen in perianale fistels. In het overzichtsartikel in **Hoofdstuk 2** gaan we ook in op de mogelijkheden om het stromale compartiment in IBD te beïnvloeden. Interessante doelwit-moleculen in dit perspectief zijn podoplanin, fibroblast-associated protein en oncostatin M (receptor), die tot expressie komen op de met ontsteking-geassocieerde groepen van stromale cellen in IBD.

In het overige, en grootste deel, van deze thesis wordt onderzoek beschreven naar de effecten van lokale MSC-therapie voor de behandeling van IBD. In zowel **Hoofdstuk 2** als **Hoofdstuk 3** wordt dit onderwerp al voorzichtig aangesneden, door MSCs te presenteren als een nieuwe stromale therapie, waarbij door het inbrengen van gezonde stromale cellen een nieuwe epitheliale en immunologische homeostase kan worden bereikt (**Hoofdstuk**

2). Daarnaast wordt in **Hoofdstuk 3** de interessante vergelijking tussen fistel fibroblasten en MSCs gemaakt, aangezien MSC-therapie een geregistreerde stromale therapie voor refractaire perianale fistels is. Hieruit blijkt onder meer dat MSCs meer transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), een anti-inflammatoir cytokine, maar ook meer oncostatin M receptor en juist minder podoplanin tot expressie brengen.

Verskillende onderzoeken hebben al de positieve korte-termijn effecten van lokale MSC-therapie voor de behandeling van perianale fistels in IBD laten zien<sup>9,7</sup>. In **Hoofdstuk 4** worden de lange-termijn effecten van allogene MSC-therapie voor de behandeling van perianale fistels in het kader van de ziekte van Crohn beschreven. Korte-termijn data van onze groep lieten al zien dat 86% van de fistels van patiënten behandeld met  $30 \times 10^6$  MSCs gesloten waren na 6 weken, tegen 22% van de fistels van patiënten behandeld met placebo<sup>3</sup>. De lange-termijn resultaten laten zien dat na vier jaar deze MSC-behandelde fistels nog steeds gesloten zijn. Uiteraard is er ook gekeken naar het bijwerkingsprofiel van MSC-therapie op de lange termijn waarbij geen toename van infecties is waargenomen in die patiënten. Wel werd in een van de patiënten een Epstein Barr virus (EBV)-geassocieerde B-cel lymfoproliferatieve ziekte (LPD) ontdekt, met ook een proces in het rectum. In **Hoofdstuk 5** staat de mogelijke relatie tussen deze maligniteit en lokale MSC-therapie beschreven. De conclusie van het onderzoek is dat EBV niet aanwezig was in het MSC product, dat zich in de LPD in het rectum geen MSCs meer bevonden en dat de kwaadaardige B-cellen niet afkomstig waren van de MSC-donor. Hierdoor wordt de kans zeer klein geacht dat de lokale MSC-therapie vier jaar eerder enig verband heeft met het ontstaan van de LPD.

Voor de start van het onderzoek, beschreven in dit proefschrift, was het gebruikelijk om in studieverband intraveneuze MSC-therapie toe te passen voor de behandeling van luminale IBD<sup>9-11</sup>. Nieuwe toedieningswegen van MSC-therapie voor luminale IBD werden geëxploreerd als beschreven in **Hoofdstuk 6** en **Hoofdstuk 7**. Met behulp van een muismodel voor IBD, de zogenaamde dextran-sodiumsulfaat-geïnduceerde experimentele colitis, onderzochten wij de effectiviteit van lokale MSC-therapie gegeven via een klysma (**Hoofdstuk 6**) of via lokale injecties in de darm (**Hoofdstuk 7**). Beide toedieningsvormen blijken in staat om de ontsteking te verminderen in vergelijking met placebo therapie. Hiermee openden we de mogelijkheid om naast perianale fistels, ook luminale ziekte, lokaal met MSCs te behandelen. De klinische toepasbaarheid van lokale MSC-therapie in proctitis ulcerosa wordt momenteel door onze onderzoeksgroep onderzocht in een fase II onderzoek bij patiënten (<https://www.trialregister.nl/trial/6949>). Bij intraveneus toegediende MSC-therapie lopen die MSCs hoofdzakelijk vast in de longen en overleven daar slechts korte tijd<sup>12,13</sup>. In **Hoofdstuk 7** wordt geïllustreerd dat lokaal geïnjecteerde MSCs na 6 dagen nog aangetoond kunnen worden in de darmwand, wat een langere overleving

van MSCs na lokale toediening suggereert. Tenslotte staat in **Hoofdstuk 6** en **7** vermeld dat naast nieuwe toedieningswegen ook de toedieningsvorm aangepast kan worden in de hoop daarmee MSC-therapie verder te optimaliseren. Hierbij worden MSCs voor lokale applicatie eerst *in vitro* geaggregeerd in clusters, zogenaamde sferoïden. We hebben vervolgens aangetoond dat verschillende cytokines, waarvan bekend is dat ze een rol spelen bij de immunologische effecten van MSC-therapie<sup>14</sup>, zoals TGF- $\beta$ 1, CD200 en hepatic growth factor, verhoogd tot expressie komen in deze MSC-sferoïden. Ondanks deze *in vitro* verschillen in cytokinen-expressie werd er geen verschil gevonden in de capaciteit van deze MSC-sferoïden om *in vivo* colitis te verminderen in vergelijking met MSCs toegediend als losse cellen. In **Hoofdstuk 8** wordt vervolgens dieper in gegaan op het mechanisme waarmee MSCs in staat zijn om experimentele colitis te verminderen. Daarbij is gekeken of exosomen, blaasjes met intracellulaire inhoud, afkomstig van MSCs, verantwoordelijk zijn voor de *in vivo* effecten van MSC-therapie, in het bijzonder op epitheliale regeneratie. We hebben daarbij gevonden dat een hoge dosis MSC-exosomen de proliferatie van epitheel cellen stimuleert en hun celdood remt, zowel in een twee-dimensionaal celmodel als in kunstmatige darmpjes, zogenaamde darm-organoiden. Celcyclus analyse laat zien dat de MSC-exosomen ervoor zorgen dat meer cellen in de S- en G2-fase van de celdeling komen ten koste van de G1-fase. Ondanks deze *in vitro* resultaten was MSC-therapie met de cellen superieur in vergelijking met MSC-exosomen-therapie in experimentele colitis bij muizen.

Tenslotte wordt in **Hoofdstuk 9** nog een ander aspect belicht dat gedacht wordt van invloed te zijn op de effectiviteit van MSC-therapie, namelijk het lokale omgevingsmilieu van de ontvanger. Eerdere studies hebben laten zien dat MSCs wellicht 'geactiveerd' moeten worden door pro-inflammatoire cytokines voordat ze hun immuno-modulatoire werking optimaal kunnen uitoefenen<sup>14,15</sup>. In dit hoofdstuk wordt beschreven hoe allereerst het cytokinen milieu in de ontstoken darm van patiënten met colitis ulcerosa en in perianale fistels van patiënten met de ziekte van Crohn in kaart werd gebracht, waarna MSCs vervolgens werden gestimuleerd met deze gevonden cytokinen profielen. De hoogste concentraties aan cytokines werden gevonden in het fistel materiaal en niet in de ontstoken darmen. Stimulatie van MSCs met de verschillende cytokinenprofielen, die de lokale cytokinen milieus van verschillende groepen IBD-patiënten weergeven, tonen verschillende effecten op de expressie van immuun-modulerende moleculen door MSCs en vervolgens ook op de capaciteiten van MSCs om immuuncellen te onderdrukken. Dit geeft aan dat het cytokinen milieu op de plaats van injectie van invloed kan zijn op de effectiviteit van lokale MSC-therapie.

Kortom, dit proefschrift laat zien dat lokale MSC-therapie een goede optie is voor de behandeling van refractaire perianale fistels bij de ziekte van Crohn. Daarnaast wordt de



potentie aangetoond van lokale MSC-therapie voor de behandeling van luminale ziekte in IBD. Tenslotte wordt het belang onderstreept van kennis over en bijdrage van stromale cellen in de pathogenese van IBD en worden nieuwe doelwit-moleculen beschreven om de pathogene stromale populaties in de darm te herstellen.

## REFERENTIES

1. Molendijk I, Nuij VJ, van der Meulen-de Jong AE, van der Woude CJ. Disappointing durable remission rates in complex crohn's disease fistula. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20:2022-8.
2. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-7.
3. Molendijk I, Bonsing BA, Roelofs H, et al. Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote healing of refractory perianal fistulas in patients with crohn's disease. *Gastroenterology* 2015;149:918-27 e6.
4. Smillie CS, Biton M, Ordovas-Montanes J, et al. Intra- and inter-cellular rewiring of the human colon during ulcerative colitis. *Cell* 2019;178:714-30.e22.
5. Kinchen J, Chen HH, Parikh K, et al. Structural remodeling of the human colonic mesenchyme in inflammatory bowel disease. *Cell* 2018;175:372-86.e17.
6. Martin JC, Chang C, Boschetti G, et al. Single-cell analysis of crohn's disease lesions identifies a pathogenic cellular module associated with resistance to anti-tnf therapy. *Cell* 2019;178:1493-508.e20.
7. Panes J, Garcia-Olmo D, Van Assche G, et al. Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (cx601) for complex perianal fistulas in crohn's disease: A phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *Lancet (London, England)* 2016;388:1281-90.
8. Duijvestein M, Vos AC, Roelofs H, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal crohn's disease: Results of a phase i study. *Gut* 2010;59:1662-9.
9. Forbes GM, Sturm MJ, Leong RW, et al. A phase 2 study of allogeneic mesenchymal stromal cells for luminal crohn's disease refractory to biologic therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014;12:64-71.
10. Dhere T, Copland I, Garcia M, et al. The safety of autologous and metabolically fit bone marrow mesenchymal stromal cells in medically refractory crohn's disease - a phase 1 trial with three doses. *Aliment Pharmacol Ther* 2016;44:471-81.
11. Zhang J, Lv S, Liu X, Song B, Shi L. Umbilical cord mesenchymal stem cell treatment for crohn's disease: A randomized controlled clinical trial. *Gut Liver* 2018;12:73-8.
12. Galleu A, Riffo-Vasquez Y, Trento C, et al. Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation. *Sci Transl Med* 2017;9.
13. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, et al. Intravenous hmscs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein tsg-6. *Cell Stem Cell* 2009;5:54-63.
14. Schepers K, Fibbe WE. Unraveling mechanisms of mesenchymal stromal cell-mediated immunomodulation through patient monitoring and product characterization. *Ann N Y Acad Sci* 2016;1370:15-23.
15. Duijvestein M, Wildenberg ME, Welling MM, et al. Pretreatment with interferon-gamma enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2011;29:1549-58.