



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Towards treatment of liver fibrosis: Cells, targets and models

Helm, D. van der

Citation

Helm, D. van der. (2021, February 11). *Towards treatment of liver fibrosis: Cells, targets and models*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/139202>

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/1887/139202>

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

Cover Page



Universiteit Leiden

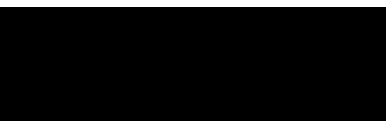


The handle <http://hdl.handle.net/1887/139202> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Helm, D. van der

Title: Towards treatment of liver fibrosis: Cells, targets and models

Issue date: 2021-02-11



Appendix

Nederlandse samenvatting

Leverfibrogenese is een ziekteproces dat in de volksmond beter bekend staat als “verlittekening van de lever”. Dit proces wordt in gang gezet als de lever gedurende een langere periode schade ondervindt. Deze beschadigingen kunnen door verschillende factoren worden veroorzaakt. De meest bekende oorzaken zijn onder andere de hepatitis B- en C-virussen, overmatige alcoholconsumptie, genetische afwijkingen, galwegproblematiek en obesitas. Ondanks de verschillende aard van deze oorzaken, activeren zij allemaal hetzelfde ziektemechanisme. Door de genoemde factoren raken de levercellen beschadigd en ondergaan een vorm van celdood, apoptose genaamd. Ter verdediging gaan de gezonde cellen van de lever delen om de dode cellen te vervangen. Dit proces van leverregeneratie zorgt ervoor dat de lever na geleden schade kan herstellen. Naast deze regeneratie vindt ook de fibrogenese (vorming van littekenweefsel) plaats.

Door de dode levercellen worden in de lever de zogenaamde stellaatcellen geactiveerd. Deze cellen gaan vervolgens delen en differentiëren/veranderen in myofibroblasten. Het zijn deze myofibroblasten die in de leverfibrose het littekenweefsel produceren. Bij kortdurende schade wordt dit proces vrij snel weer stilgelegd en wordt het littekenweefsel weer opgeruimd, zoals bij een wondje op de huid bijvoorbeeld. Echter, als een lever chronische (langdurige) schade ondervindt heeft deze geen tijd om tussen de schades door te herstellen en zo ontstaat er leverfibrose. Zolang de fibrogenese voortduurt stapelt het littekenweefsel zich op en zal de lever gaan verstijven. Door deze verstijving kan het bloed minder goed door de lever stromen, wat tot verhoogde druk in de poortader en aders van de buik (portale hypertensie) kan leiden. Ook kunnen er mogelijk ontstekingsprocessen en/of galstuwingsplaatsen gaan vinden welke tot nog meer celdood kunnen leiden. Vervolgens zal het ziekteproces in een neerwaartse spiraal terechtkomen, waarbij de lever zelf niet meer kan herstellen. Als dit proces langere tijd aanhoudt ontstaat levercirrose, een hobbelige lever, bestaand uit een netwerk van bindweefsel/littekenweefsel, waartussen door regeneratie ontstane knobbels van leverweefsel liggen. Geleidelijk kan de lever zijn functie niet meer naar behoren uitoefenen en ontstaat er een eindstadium, leverfalen genaamd. Naarmate de leverfibrogenese langer blijft bestaan, wordt de kans ook groter dat er zich kwaadaardige levertumoren (primaire leverkanker, oftewel hepatocellulair carcinoom) ontwikkelen.

Een van de grootste risico's van leverfibrose is dat dit vaak aanwezig is zonder dat een patiënt er al last van heeft. Dit geeft de ziekte de kans om langere tijd door te woekeren, waardoor het vaak pas in een vergevorderd stadium ontdekt wordt. Tot op heden bestaat de behandeling van leverfibrose en cirrose uit het wegnemen van de oorzaken van de ziekte, zoals het stoppen met de consumptie van alcohol of behandeling van de virale infectie. In enkele gevallen kan dit tot omkering en genezing van de fibrose leiden, maar in sommige gevallen ontkomt men

niet aan een levertransplantatie of zal de patiënt aan de leverziekte overlijden. Ondanks het voortschrijden van de techniek blijft een levertransplantatie een grote operatie met risico's en 15% tot 20% van de mensen op de wachtlijst overlijdt door het gebrek aan orgaandonoren. Therapieën die direct aangrijpen op het proces van fibrogenese en dit remmen, tegengaan of omkeren zijn in ontwikkeling, maar nog niet geregistreerd of beschikbaar.

Wetenschappelijk onderzoek heeft aangetoond dat mesenchymale (stromale) stamcellen (MSCs) het herstel en de regeneratie van organen kunnen stimuleren. Deze MSCs bevinden zich in vele weefsels, zoals beenmerg, vet en de navelstreng, en kunnen relatief makkelijk geïsoleerd en tot grote hoeveelheden opgekweekt worden. Onderzoeken hebben ook laten zien dat MSCs van gezonde donoren veilig bij patiënten toegediend kunnen worden. Dit wetende zouden MSCs dus ook een mogelijke toepassing in de behandeling van leverfibrose en cirrose kunnen hebben.

In ons onderzoek met muismodellen voor leverfibrose en cirrose toonden we aan dat lokale toediening (direct in de lever) van MSCs tot een vermindering van de fibrose leidt, zoals beschreven in **hoofdstuk 2** van dit proefschrift. In tegenstelling tot de lokale toediening werd gevonden dat intraveneuze toediening (via de bloedvaten) van MSCs geen effect had. Ook observeerden we, na een operatieve verwijdering van ongeveer 70% van het aangedane fibrotische leverweefsel (partiële leverresectie), een aangroei van gezonder leverweefsel door regeneratie. Deze bevindingen motiveerden ons om de partiële leverresectie met de lokale toediening van MSCs te combineren als mogelijke behandeling bij leverfibrose. De uitkomsten van deze experimenten lieten zien dat deze samenvoeging het resultaat van beide interventies versterkte en tot een grotere vermindering van fibrose en cirrose in het muismodel leidde.

MSCs worden gekenmerkt door hun vermogen om tot bot, kraakbeen en vetweefsel te differentiëren. Daarnaast worden de cellen ook getypeerd door de aan- en afwezigheid van specifieke eiwitten op het celmembran (omhulsel van de cel). Met inachtneming van deze karakteristieken bleek dat MSCs niet altijd zowel VCAM als Endoglin op het membraan tot expressie brachten. Mogelijke verschillen tussen subpopulaties van MSCs, op basis van deze kenmerken, met betrekking tot de toepassing in de behandeling van leverfibrose werden verder onderzocht, als beschreven in **hoofdstuk 3**. Voor deze studie selecteerden we, op basis van VCAM en Endoglin expressie, vier verschillende subpopulaties van MSCs (1: VCAM-positief + Endoglin-positief, 2: VCAM-positief + Endoglin-negatief, 3: VCAM-negatief + Endoglin-positief en 4: VCAM-negatief + Endoglin-negatief). Vervolgens werd bestudeerd of deze cellen een verschillend therapeutisch effect in de vermindering van leverfibrose hadden. In ons model voor leverfibrose ondergingen muizen een partiële leverresectie en vervolgens werden de verschillende MSC subpopulaties lokaal toegediend. Uit dit onderzoek kwam naar voren dat de MSCs die VCAM tot expressie brachten, subtypen 1 en 2, tot een grotere vermindering van het littekenweefsel in de lever leidden dan de VCAM-negatieve MSCs, subtypen 3 en 4.

Interessant genoeg vertoonden deze laatste cellen zelfs helemaal geen therapeutisch effect. Celkweek modellen onderbouwden de resultaten uit het proefdiermodel en lieten zien dat de VCAM-positieve MSCs tot een versnelde celdeling van de levercellen leidden en daarnaast ook de levercellen tegen celdood beschermden. De productie van Hepatocyt-groefactor (HGF) door MSCs wordt gezien als één van de drijvende krachten achter het bovenstaande therapeutisch effect van MSCs in leverfibrose. Toen we de mate van HGF productie van de 4 genoemde MSC-subpopulaties met elkaar vergeleken bleek dat de VCAM-positieve MSCs de hoogste HGF-expressie hadden. Deze bevinding zou een mogelijke verklaring voor de resultaten uit het proefdiermodel kunnen zijn. Op basis van de resultaten van dit onderzoek is ons advies om alleen VCAM-positieve MSCs voor de behandeling van leverfibrose te gebruiken.

Proefdieren zijn van wezenlijk belang voor het bestuderen van verschillende ziekten en de ontwikkeling van nieuwe behandelingen. Uiteraard is de Nederlandse en Europese wetgeving zo ingericht dat mogelijk leed van de proefdieren tot een minimum beperkt blijft. In de muismodellen voor het onderzoek uit dit proefschrift werd leverfibrose opgewekt door chronische toediening van CCL4. Voor de fibrose of cirrose moesten de muizen relatief lang (6-12 weken) met dit stofje geïnjecteerd worden. De inductie van leverfibrose of cirrose is dus een lange, tijdrovende en kostbare periode waarin de muizen veel aangerakt en geïnjecteerd worden. Dit bracht ons op het idee om een ander proefdiermodel voor leverfibrose met minimaal dierenleed te ontwikkelen, dat bovendien goedkoper en makkelijk hanteerbaar is. Zebravis embryo's worden al in vele onderzoeken gebruikt, maar hadden tot nu toe nog geen toepassing op het gebied van onderzoek naar leverfibrose gevonden. Deze embryo's zijn goedkoop en de lichamelijke (ontwikkelings-)processen vertonen grote gelijkenissen met de mens. In het onderzoek van **hoofdstuk 4** werd een zebravis embryomodel voor leverfibrose ontwikkeld door gedurende 6 dagen TAA aan het aquarium water toe te voegen. TAA is een toxisch stofje dat schade aan de lever toebrengt. Deze schade leidt tot celdood en vervolgens activatie van de lever fibrogenese. De genexpressie- en eiwit-profielen van dit model lieten zien dat het ziektemechanisme achter deze leverfibrose nagenoeg hetzelfde is als bij de muis en de mens. Om de toepasbaarheid van dit model aan te tonen werden op de vierde dag van TAA behandeling MSCs ter plaatse van de lever ingespoten in de embryo's. Twee dagen na de MSC toediening werd de ernst van de leverfibrose bestudeerd en werden overeenkomstige bevindingen als beschreven in de **hoofdstukken 2 en 3** waargenomen. De MSC behandeling zorgde ook in dit model namelijk voor minder myofibroblasten en minder littekenweefsel.

Alhoewel de pathofysiologie (het onderliggende ziekteproces) van leverfibrose in grote lijnen bekend is, worden er steeds nieuwe ontdekkingen gedaan die in de toekomst mogelijk tot nieuwe behandelmethoden kunnen leiden. Zo werd recent aangetoond dat patiënten met een levercirrose als gevolg van een virusinfectie verhoogde spiegels van het eiwit "Cripto" in hun bloed hadden. Cripto is een eiwit waarvan gedacht werd dat het alleen tijdens de embryogenese (ontwikkeling van baby's) en oncogenese (ontstaan en progressie van

tumoren) een rol speelde. De verhoogde levels van Cripto in het bloed van cirrose patiënten waren dus zeer onverwacht. Het is bekend dat Cripto cellen kan beschermen tegen celdood maar ook de cellen kan aanzetten tot delen en differentiëren. De deling en overleving van levercellen zijn ook belangrijk bij leverfibrose. Daarom hebben we daar onderzoek naar gedaan, beschreven in **hoofdstuk 5**, waaruit bleek dat de levers van mensen met cirrose en levers van zebravis embryo- en muismodellen voor leverfibrose meer Cripto tot expressie brengen dan in de gezonde situatie. De hoogte van deze expressie bleek in de mens ook te correleren met de ernst van de ziekte. Daarnaast vonden we verhoogde Cripto spiegels in het bloed van patiënten met levercirrose en bleek bij de mens dat deze spiegels ook weer normaliseerden als de aangedane lever middels een transplantatie werd vervangen door een gezonde donorlever. Samenvattend geeft dit onderzoek aanwijzingen voor de betrokkenheid van Cripto bij leverfibrose in zowel mens, muis als zebravis. Ook geeft het voldoende aanleiding tot verder onderzoek naar de ware rol van Cripto in leverfibrose. In de toekomst zou dit tot nieuwe inzichten en eventuele alternatieve behandelmethodes kunnen leiden. Zo kunnen we ook speculeren over de mogelijke rol van deze Cripto expressie in de MSC behandelingen van de studies uit **hoofdstukken 2, 3 en 4**. Zo heeft ander onderzoek aangetoond dat MSCs meer HGF gaan produceren als deze met Cripto in aanraking komen. Zoals eerder beschreven wordt er gedacht dat HGF een grote rol speelt bij de effectiviteit van MSC-therapieën in leverfibrose. Volgens deze theorieën zou HGF namelijk direct aangrijpen op de cellen die het littekenweefsel produceren en hiermee de fibrogenese remmen/stilleggen. Daarnaast speelt HGF ook een rol bij de regeneratie (vormen van nieuw weefsel). Samenvattend en heel speculatief zou deze directe relatie tussen de mate van Cripto expressie van de aangedane lever met de mate van HGF expressie van de MSCs het werkingsmechanisme en de dosis response van de MSC-therapieën uit de diverse hoofdstukken kunnen verklaren. Verder onderzoek is echter nodig om deze hypothese te toetsen.

Daarnaast is er ook de bekende betrokkenheid van Cripto bij het ontstaan, de progressie en metastasering (uitzaaiing) van verschillende maligniteiten. Een mogelijke rol van Cripto in de ontwikkeling van het hepatocellulaire carcinomen (HCC ofwel levertumoren) was tot voor kort nog onbekend. In de studie van **hoofdstuk 6** werd de mogelijke expressie en functie van Cripto in het ontstaan en de progressie van HCCs onderzocht. Onze bevindingen laten zien dat er een subpopulatie van HCCs bestaat die Cripto tot expressie brengt en dat juist deze tumoren minder gevoelig voor de bestaande medicamenteuze behandeling (tyrosinekinaseremmers) lijken te zijn. Kortom, patiënten met dit subtype HCC zouden dus mogelijk niet gebaat zijn bij deze zware behandeling. Klinisch relevant is dat we in een experimentele setting hebben aangetoond dat we dit type tumoren weer gevoelig voor de bestaande behandeling kunnen maken door deze medicatie gelijktijdig met een Cripto-remmend eiwit toe te dienen. Er zal echter nog veel onderzoek nodig zijn om de effectiviteit en veiligheid van deze remmers aan te tonen.

Concluderend hebben we met de diverse onderzoeken uit dit proefschrift aangetoond dat een partiële leverresectie tezamen met lokale toediening van MSCs leidt tot een betere aangroei van gezonder leverweefsel dan met een resectie of MSCs alleen. Daarnaast hebben we aanwijzingen gevonden die er op duiden dat er verschillende subpopulaties van MSCs zijn en dat juist de VCAM-positieve subpopulaties de beste anti-fibrotische werking hebben. Ook hebben we laten zien dat zebravis embryo's leverfibrose kunnen ontwikkelen en dat dit ziektemechanisme vergelijkbaar is met dat bij mens en muis. In het tweede deel van het proefschrift staat beschreven dat levercellen, tijdens leverfibrose, Cripto tot expressie brengen en dat de mate van expressie met de ernst van de ziekte correleert. In het laatste hoofdstuk staan de waarnemingen beschreven dat er een kwaadaardige subpopulatie van levertumoren bestaat die Cripto tot expressie brengt en om die reden resistent voor behandeling met een tyrosinekinaseremmer is, welke gevoeligheid terugkomt als een Cripto-remmer toegevoegd wordt.

Kortom, dit proefschrift laat zien dat mesenchymale (stromale) stamcellen een toepassing in de behandeling van leverfibrose zouden kunnen hebben en dat Cripto een nieuwe speler in de fibrose-cirrose-HCC ziektecascade is.