Universiteit
Leiden
The Netherlands

From immune suppression to immune modulation in type 1 diabetes patients

Megen, K.M. van

Citation

Megen, K. M. van. (2021, October 5). *From immune suppression to immune modulation in type 1 diabetes patients*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/3214562

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/1887/3214562

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

Chapter 8

Summaries (English & Dutch)

List of Publications

Acknowledgements

Curriculum Vitae

English Summary

Type 1 diabetes (T1D) is an auto-immune disease characterized by a T-cell mediated attack on the β cells in the pancreas. Beta cells produce insulin, which lowers blood glucose levels by facilitating the uptake of glucose by peripheral tissues. Therefore, T1D is diagnosed by high blood glucose levels. Recently, a new staging system was introduced that diagnoses T1D before the clinical manifestation of hyperglycemia (stadium 3). Hereby T1D is diagnosed when patients have two or more autoantibodies (stadium 1) and dysglycemia (stadium 2) to build the stage for late prevention or early intervention before disease onset. What exactly causes the onset of diabetes has not yet been unraveled. The immune system is dysregulated in T1D, which leads to destruction of β cells by autoreactive T-cells that have been activated by antigen-presenting dendritic cells. T-cells consequently activate B-cells, which produce autoantibodies that can help with the diagnosis of T1D. After T1D diagnosis, insulin treatment is started to avoid hyperglycemia, to treat the symptoms but not the cause of T1D.

Except for insulin, there are no approved therapies for T1D. Many immune intervention therapies have been investigated, but with limited success. Mono immunotherapies, which consist of antibodies against a certain immune cell, such as CD3+ T-cells or a cytokine, were often times only effective for a certain period of time and only in subgroups of patients. Antigen-specific therapies hold promise because they can selectively inhibit the immune system without causing general immune suppression. Nevertheless, these early efforts struggled to slow disease progression and only show subgroup effectivity at best. Antigen-specific strategies could be combined with cellular therapies to improve their potency, as is accomplished with tolerogenic dendritic cells. In this thesis, various therapies for T1D have been evaluated to gain insights for future T1D therapies.

Firstly, in **part I** the foundation is set for the notion that T1D could be reversed by immunotherapies. In **chapter 2** of part I, the opportunity of using autologous hematopoietic stem cell transplantation (aHSCT) as a treatment for T1D is discussed. Autologous HSCT is thus far the most effective therapy for T1D, resulting in insulin independence in 21 out of 25 patients for a median of 43 months. The success of this therapy is, however, hampered by the possible risks, although mortality has decreased to <1% in recent years. Post-hoc analyses concluded that patients had a better outcome when they had a low auto-immune signature, no diabetic ketoacidosis, and remaining c-peptide secretion prior to the aHSCT. Therefore, we propose that aHSCT should be considered in patients that meet the above-mentioned characteristics and should be discussed through informed decision-making involving the patient and their caregivers.

Many patients will likely value aHSCT as too risky or invasive, even though this is standard of care as successful cancer therapy. Therefore, another immunotherapy was presented in **chapter 3** that also caused the reversal of T1D. A case report showed that a T1D patient became insulin independent repeatedly for several months after intravenous injection of immunoglobulins (IVIG). This illustrates that T1D patients could restore their endogenous insulin production, even after diagnosis and offers hope for immunotherapies as a treatment for T1D. We further concluded that β cell mass does not equal function, as this patient was able to produce sufficient insulin again resulting in insulin independence with presumably the same (or less) β cell mass as when she required insulin. It is yet unclear why this patient responded to IVIG, whereas a randomized controlled IVIG trial was unsuccessful. Like every patient, this case is unique and presented with multiple co-morbid conditions, such as chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) and Graves' disease. Therefore, this study reminds us that personalized medicine is of utmost importance and that we need to keep studying individual cases and subgroups to understand disease and heterogeneity thereof, to then apply or develop a successful, tailored therapy for every patient with T1D.

In conclusion, in part I we present that T1D can be reversed by immunotherapy, even though these specific therapies might not be successful or applicable in all cases. Therefore, alternative, milder, targeted and antigen-specific therapies were studied in **part II**. In **chapter 4**, we investigated the stability and reproducibility of tolerogenic dendritic cells (tolDCS) that, when pulsed with peptide, confer antigen-specific immune suppression. TolDCs were produced by treating monocytes of healthy subjects and T1D patients *ex vivo* with VD3 and dexamethasone. The profile of tolDCs was similar between healthy subjects and T1D patients with regards to transcriptomics, methylomics and function. Besides, there was no difference between two international production sites of tolDCs, paving the way for multicenter and international implementation of tolDC therapy. Furthermore, tolDCs were differentially methylated compared to inflammatory dendritic cells and neither changed their phenotype nor function after stimulation with inflammatory stimuli. Both results indicate a stable function of tolDCs. We conclude that tolDCs are a promising, stable, and reproducible therapy for T1D. Next to tolDCs, mesenchymal stromal cells (MSCs) were investigated as a possible antigen-specific cell therapy in **chapter 5**. MSCs are inherently immunomodulatory and thus perfect candidates to be used as 'adjuvant' in antigen-specific therapy. We showed that MSCs express HLA class II in an inflammatory milieu, which is necessary to present antigen to CD4 T-cells and Tregs. This activation did not cause secretion of pro-inflammatory proteins, but instead led to increased expression of immune inhibitory markers such as PD-L1 and IDO. Antigen-pulsed MSCs inhibited proliferation of antigen-specific T-cells, even when these MSCs were no longer present in the co-culture of T-cells and APC. These

results encourage the use of MSCs as an antigen-specific therapy in addition to their natural immunomodulatory function.

Besides immunomodulatory therapies, it is important to optimize the microenvironment of the β cells in the islets of Langerhans. Therefore, in **part III**, **chapter 6**, we investigated whether MSCs could be isolated from the pancreas and whether these could display properties that could benefit β cell vitality and function. We have successfully isolated MSCs from the conventionally discarded pancreas tissue of pancreatic islet isolation. These MSCs secreted more anti-inflammatory factor (TSG-6) and pro-angiogenic factors (VEGF, IL-6, and Il-8) after activation with TNF-α and DMOG. Consequently, these MSCs could have a beneficial effect on the islets of Langerhans with regards to islet transplantation or *in vivo* in T1D patients.

In the **discussion,** five challenges to finding a successful therapy for T1D are addressed. First of all, insulin should not be perceived as a cure for T1D, as long-term complications cannot be prevented, even with optimal insulin therapy. Therefore, we propose to adjust the current T1D staging system to appreciate the full scope of the disease—including complications—in order to underscore that insulin is insufficient to counteract the disease process. The second challenge is the dilemma between risk and benefit of T1D therapy. This dilemma might be alleviated if good inclusion criteria are used for risky treatments so that only patients with the highest chance of benefit would receive the treatment. This further emphasizes the importance of recognizing heterogeneity between T1D patients and how they respond to therapies, which presents the third challenge. The fourth challenge is to identify asymptomatic T1D patients ('stage' 1 and 2). In the future, autoantibody and genetic screening could identify some of these prodromal T1D patients, which could concomitantly reduce the incidence of diabetic ketoacidosis and prompt early treatment to preserve c-peptide secretion. The last challenge is to expand the goals of T1D therapy from treating the symptoms and finding a direct cure to increasing quality of life. At present, therapies are being dismissed because they do not show a sustained effect on c-peptide, although they do cause a slower decline of c-peptide over a couple of years. These therapies could be worthy to pursue, as we now know that even minimal remaining c-peptide secretion could reduce complications later in life. Eventually, immunotherapies should be combined with therapies that improve β cell vitality to offer a sustained beneficial effect for T1D patients.

Nederlandse Samenvatting

Van onderdrukken naar moduleren van het immuunsysteem in type 1 diabetes patiënten

Type 1 diabetes (T1D) is een auto-immuun ziekte die wordt gekarakteriseerd door een T-cel gemedieerde aanval op de β cellen in de alvleesklier. Beta cellen produceren insuline, wat ervoor zorgt dat het glucose gehalte in het bloed daalt door opname van glucose in weefsels. Vandaar dat T1D gediagnosticeerd wordt op basis van hoge bloedglucose waardes. Recentelijk is er een nieuwe stagering van T1D geïntroduceerd, welke de diagnose vervroegt naar de periode voorafgaand aan de hyperglycemie en klinische presentatie (diagnose) van T1D (stadium 3). Hierbij wordt T1D al gediagnosticeerd als patiënten twee of meer autoantistoffen hebben (stadium 1) of daarbij verstoorde bloedsuikerregulatie (dysglycemie; stadium 2). Wat precies de aanleiding geeft tot het ontwikkelen van T1D is nog onduidelijk. In T1D is het immuunsysteem niet voldoende gereguleerd wat leidt tot destructie van β cellen door autoreactieve T-cellen die zijn geactiveerd door antigeen-presenterende dendritische cellen. T-cellen activeren ook B-lymfocyten, welke vervolgens autoantistoffen uitscheiden die helpen in de diagnose van T1D. Na T1D diagnose wordt insuline gegeven als behandeling tegen de hyperglycemie.

Er zijn geen interventietherapieën goedgekeurd voor T1D, behalve toediening van insuline. Vele immuuntherapieën zijn onderzocht, maar met beperkt succes. Mono immuuntherapieën, wat vaak antistoffen zijn tegen een bepaalde immuun cel (zoals T-cellen) of een cytokine, waren vaak alleen effectief voor een beperkte periode en alleen in subgroepen van patiënten. Antigeen-specifieke therapieën zijn veelbelovend omdat ze het immuunsysteem gericht zouden kunnen reguleren, zonder algehele immuun onderdrukking te veroorzaken. Net als bij de mono immuuntherapieën, konden antigeen-specifieke therapieën de uitscheiding van een bijproduct van insuline (c-peptide; wat wordt gebruikt als meetwaarde van insuline uitscheiding) in het beste geval alleen in een subgroep behouden, maar er is nog veel ruimte om veranderingen toe te passen in de opzet van deze studies. Antigeen-specifieke therapieën kunnen bijvoorbeeld worden gecombineerd met cellulaire therapieën om hun potentie te verhogen, zoals wordt gedaan bij tolerogene dendritische cellen. Dendritische cellen zijn de docenten van het immuunsysteem; zij leren aan andere afweercellen of zij in actie moeten komen tegen een antigeen of juist het antigeen moeten accepteren als lichaamseigen. In dit proefschrift zijn verschillende therapieën voor T1D onderzocht met het doel om een aanbeveling te doen voor de toekomst van T1D therapieën.

Ten eerste is in **deel I** de basis gelegd voor de uitspraak dat T1D teruggedraaid kan worden door immuuntherapie. In **hoofdstuk 2** van deel I wordt de mogelijkheid van autologe hematopoiëtische stam cel transplantatie (aHSCT) als therapie voor T1D besproken.

Autologe HSCT betreft stamcellen uit het bloed van de patiënt die een nieuw afweersysteem kunnen vormen. Het is tot dusver de meest effectieve therapie voor T1D met 21 van de 25 patiënten die insuline onafhankelijk werden voor gemiddeld drieënhalf jaar. Het succes van deze therapie wordt echter overschaduwd door de mogelijke risico's; hoewel de kans op overlijden in de laatste jaren is gedaald naar minder dan 1%. Achteraf is gebleken dat patiënten die voorafgaand aan de aHSCT een lager auto-immuun profiel hadden, geen bloedverzuring (diabetische ketoacidose) en resterende c-peptide uitscheiding hadden, een beter resultaat boekten na aHSCT. Wij betogen dat als patiënten geselecteerd worden op deze kenmerken, zij de kans moeten krijgen om in samenspraak met de behandeld arts gebruik makende van *informed decision making* voor aHSCT te kiezen.

Veel patiënten zullen een aHSCT echter als te riskant en ingrijpend achten, vandaar dat in **hoofdstuk 3** een alternatieve immuuntherapie gepresenteerd wordt. Een case report laat zien dat een T1D patiënt bij herhaling insuline onafhankelijk werd voor meerdere maanden na intraveneuze toediening van immunoglobulines (antistoffen) (IVIG). Dit resultaat illustreert dat T1D patiënten, zelfs na diagnose, voldoende werkzame β cellen kunnen hebben voor hun eigen insuline productie en biedt hoop voor immuuntherapieën als behandeling voor T1D. Wij concluderen dat β cel massa niet hetzelfde is als functie, maar ook dat β cellen soms niet meer werken, hoewel ze er nog wel zijn. Deze patiënt was een unieke casus aangezien ze leed aan verschillende andere ziekten zoals, chronische inflammatoire demyeliniserende polyneuropathie (CIDP) en de ziekte van Graves. Deze studie herinnert ons daarom eraan dat persoonsgebonden geneeskunde belangrijk is en dat we naar individu en subgroepen moeten blijven kijken om een succesvolle, op maat gemaakte therapie te kunnen vinden voor elke patiënt met T1D.

Samengevat hebben we in deel I laten zien dat T1D teruggedraaid kan worden door middel van immuuntherapie, maar dat die specifieke therapieën niet succesvol of toepasbaar zullen zijn in alle gevallen. Daarom werden andere mildere, gerichte en antigeen-specifieke therapieën bestudeerd in **deel II**. In **hoofdstuk 4** onderzochten wij de stabiliteit en reproduceerbaarheid van tolerogene dendritische cellen (tolDCs), die gepulsed zijn met een antigeen en zo antigeen-specifieke immuun onderdrukking teweegbrengen. TolDCs werden geproduceerd door de monocyten van gezonde vrijwilligers en T1D patiënten buiten het lichaam te behandelen met vitamine D3 en dexamethason. Het profiel van de tolDCs was vergelijkbaar tussen gezonde vrijwilligers en T1D patiënten op mRNA, functie en DNA methylatie niveau. Bovendien was er ook geen statistisch significant verschil geobserveerd tussen twee internationale productie locaties van de tolDCs, wat gunstig is voor de internationale implementatie van tolDCs. Daarnaast hadden tolDCs een andere epigenetisch profiel dan inflammatoire dendritische cellen en veranderden ze niet op fenotype en functie niveau in reactie op ontstekings stimuli. Beide

bevindingen wijzen op een stabiele functie van tolDCs. Concluderend lijken tolDCs een veelbelovende, reproduceerbare en stabiele therapie voor T1D. Naast tolDCs, werden ook mesenchymale stromale cellen (MSCs) onderzocht als antigeen-specifieke therapie in **hoofdstuk 5**. MSCs zijn van nature al immuunmodulerend en weefselherstellend en dus ideale kandidaten om te benutten als antigeen-specifieke therapie. Wij lieten zien dat MSCs geactiveerd met pro-inflammatoire cytokinen eiwitten tot expressie brengen die nodig zijn om het immuunsysteem te activeren. Deze activatie leidde niet tot de aanmaak van ontstekingsfactoren en MSCs maakten zelfs meer ontstekingsremmende factoren aan, zoals PD-L1 en IDO. Antigeen-gepulsde MSCs konden de groei van T-cellen die reageerden op dat antigeen onderdrukken, zelfs als de MSCs niet meer aanwezig waren in de co-culture van afweercellen. Deze resultaten ondersteunen het gebruik van MSCs als antigeen-specifieke immuunmodulerende therapie.

Naast immuunmodulerende therapieën is het belangrijk om een zo optimaal mogelijke omgeving te creëren voor de β cellen in de eilandjes van Langerhans. Daarom onderzochten wij in **deel III**, **hoofdstuk 6**, of MSCs ook verkregen konden worden uit de pancreas en of zij de microenvironment van β cellen zouden kunnen verbeteren. Uit het weefsel dat normaal wordt weggegooid tijdens het isoleren van eilandjes van Langerhans voor transplantatie, hebben wij succesvol MSCs geïsoleerd. MSCs scheidden meer ontstekingsremmende factor (TSG-6) en factoren die bloedvaten vormen (VEGF, Il-6, and Il-8) uit na activatie met TNF-alpha en DMOG. Deze anti-inflammatoire en angiogene factoren zouden een gunstig effect kunnen hebben op donor eilandjes na transplantatie, of in de alvleesklier van T1D patiënten zelf.

In de **discussie** worden vijf uitdagingen voor het vinden van een succesvolle therapie voor T1D besproken. Ten eerste, zal er geaccepteerd moeten worden dat insuline therapie niet de uiteindelijke oplossing is, aangezien zelfs met optimale insuline therapie complicaties niet geheel voorkomen kunnen worden op lange termijn. Daarom stel ik een nieuwe T1D stagering voor waarin het gehele ziekteproces van T1D wordt gewaardeerd en complicaties worden gecategoriseerd om te illustreren dat insuline onvoldoende is om dit ziekteproces tegen te gaan. De tweede uitdaging is het dilemma tussen risico en voordeel van een therapie voor T1D. Dit dilemma zal verlicht worden als er goede selectiecriteria worden opgesteld voor risicovolle therapieën, waardoor alleen patiënten de therapie krijgen die de hoogste kans hebben op voordeel. Dit benadrukt meteen het belang van het onderkennen van diversiteit van de ziekte en verschillen tussen T1D patiënten, en hoe ze op therapieën reageren, wat de derde uitdaging is. Ten vierde, is de identificatie van asymptomatische T1D patiënten een uitdaging (stadium 1 en 2). Door autoantistof en genetische screening zouden sommige T1D patiënten in de toekomst vroeg geïdentificeerd kunnen worden, waardoor vroege complicaties zoals diabetische ketoacidose voorkomen kunnen worden en alvast een therapie gestart kan worden om c-

peptide secretie te behouden. De laatste uitdaging is dat we het doel van T1D therapie bij moeten stellen van directe genezing naar verbetering van kwaliteit van leven. Op dit moment worden therapieën afgekeurd omdat ze niet een langdurig effect hebben, ook al zorgen ze wel voor een langzamere c-peptide daling voor enkele jaren. Deze therapieën kunnen waardevol zijn, aangezien we nu weten dat zelfs minimale eigen insuline productie complicaties later in het leven kan verminderen. Uiteindelijk moeten immuuntherapieën gecombineerd worden met therapieën die gericht zijn op de β cellen om een langdurig effect te hebben in T1D patiënten.