

## RIGENERAZIONE $\beta$ -CELLULARE ENDOGENA: POTENZIALE STRATEGIA PER IL RECUPERO DELLA CARENZA DI CELLULE $\beta$ NEL DIABETE

Responsabile Editoriale  
**Renato Cozzi**

Il diabete mellito di tipo 1 (DM1) è una malattia autoimmune caratterizzata dalla distruzione delle cellule  $\beta$  produttrici di insulina. Studi autoptici hanno dimostrato che un cospicuo deficit della massa  $\beta$ -cellulare è presente non solo nel DM1, ma anche in quello di tipo 2. Per tale ragione **la rigenerazione della massa  $\beta$ -cellulare** potrebbe rappresentare un **potenziale obiettivo terapeutico per il ripristino della secrezione insulinica** perduta (1).

Il trapianto allogenico di isole pancreatiche si è rivelato un approccio terapeutico importante per la terapia cellulare per i pazienti con DM1, che ripristina un buon controllo della glicemia e un miglioramento delle complicanze croniche e della qualità della vita. Tuttavia, nonostante questi risultati promettenti, rimane un approccio terapeutico limitato, a causa della carenza di donatori e della necessità di immuno-soppressione costante. Negli ultimi anni sono stati studiati diversi approcci che utilizzano cellule staminali e la rigenerazione cellulare per supportare la sopravvivenza e la funzione delle isole in modelli animali e contesti pre-clinici. Un recente lavoro (2) descrive i più importanti approcci di sostituzione o rigenerazione  $\beta$ -cellulare sviluppati negli ultimi anni, concentrandosi su progressi, ostacoli e limiti.

### REPLICAZIONE DELLE $\beta$ -CELLULE PRE-ESISTENTI

Le cellule  $\beta$ -pancreatiche sono in grado di replicarsi nella vita fetale e neonatale. Nei modelli murini questa capacità persiste in condizioni particolari: per esempio, durante la gravidanza, si può avere un'espansione della massa  $\beta$ -cellulare promossa dagli ormoni legati alla lattazione. Tale **capacità è invece estremamente limitata nell'uomo**. Molti agenti mitogeni (GLP-1, GIP, IGF-1) stimolano la proliferazione  $\beta$ -cellulare nei roditori ma non nell'uomo.

La proliferazione  $\beta$ -cellulare è mediata da molteplici vie mitogeniche (IRS, mTOR, RAS/RAF/ERK, ecc), a loro volta regolate da nutrienti (glucosio, calcio), ormoni (leptina, estrogeni, PRL, progesterone) ed entero-ormoni (GLP-1, GIP).

Molti stimoli esogeni sono in grado di stimolare la replicazione  $\beta$ -cellulare nei modelli murini giovani. Studi sulle cellule  $\beta$ -umane *in vitro* o su topi NGS (trapiantati con cellule umane) hanno evidenziato un ruolo positivo sulla replicazione  $\beta$ -cellulare di:

- inibitori del DYRK1A, che aumentano la proliferazione  $\beta$ -cellulare inibendo la via di segnale calcineurina/Nfat/Dyrk1a;
- osteoprotegerina e denosumab, mediante attivazione della via di segnale del NF- $\kappa$ B.

Il grosso limite di tale metodica è l'applicabilità, in quanto spesso i pazienti affetti da DM1 non hanno massa  $\beta$ -cellulare residua; inoltre appare difficile attuare una stimolazione mirata in contesti *in vivo*.

### RIPROGRAMMARE ALTRE CELLULE PANCREATICHE IN $\beta$ -CELLULE

Durante lo sviluppo embrionale, le  $\beta$ -cellule originano da progenitori pancreatici multi-potenti, in grado di differenziarsi in progenitori esocrini ed endocrini, con un processo controllato da fattori di trascrizione. Aumentare la differenziazione in  $\beta$ -cellule è uno dei possibili approcci per incrementare la massa  $\beta$ -cellulare. Le alternative sono fondamentalmente due.

#### 1. Stimolare la differenziazione di progenitori pancreatici a $\beta$ -cellule

La necessità di ottenere una fonte illimitata di  $\beta$ -cellule pancreatiche ha stimolato studi sulla differenziazione delle cellule staminali pluripotenti (PSC) in cellule  $\beta$ . **Cellule staminali embrionali (ESC)** e **cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC)** si sono rivelate i potenziali candidati più promettenti per il raggiungimento di questo obiettivo, a causa dell'elevato potenziale differenziativo e dell'illimitata capacità di proliferazione mantenendo uno stato indifferenziato (auto-rinnovamento). La principale differenza tra gli studi sinora pubblicati riguarda il grado di maturazione delle cellule impiantate e la conseguente tempistica di regressione della malattia.



**Laura Molteni** ([dottlauramolteni@gmail.com](mailto:dottlauramolteni@gmail.com))

Centro Ambulatoriale di Diabetologia ed Endocrinologia, Ospedale Sacra Famiglia - Fatebenefratelli, Erba (CO)

È ancora in discussione se sia meglio trapiantare cellule  $\beta$  mature o quasi mature o cellule progenitrici pancreatiche capaci di un'elevata efficienza differenziativa *in vivo*. La scelta delle cellule a differenti stadi di maturazione ha implicazioni sulla **sicurezza**: le cellule allo stadio di progenitori hanno maggiore capacità proliferativa e un certo grado di plasticità, che si riduce nelle cellule differenziate mature, rendendo queste ultime in teoria più sicure. L'approccio terapeutico legato all'utilizzo di PSC differenziate *in vitro* o *in vivo* è ancora molto dibattuto, a causa della possibilità di formazione di tumori, legati all'eventuale presenza di cellule indifferenziate residue fra le cellule producenti insulina ottenute tramite il differenziamento *in vitro*. Inoltre rimangono ancora numerosi problemi associati all'uso di ESC: l'eticità dell'utilizzo di embrioni umani per la produzione di linee ESC e il rigetto di queste linee cellulari da parte del sistema immunitario dei riceventi in caso di trapianto.

Le **possibili soluzioni per la generazione di linee iPSC il più possibile sicure** sono:

- metodi di trasferimento non virali, mediante trasposoni di geni per la riprogrammazione di cellule somatiche in iPSC, con cui è possibile ottenere iPSC più sicure, meno inclini alla mutagenesi;
- utilizzo e identificazione di marcatori di superficie, che consentono la selezione della popolazione cellulare desiderata e l'eliminazione delle cellule pluripotenti residue;
- introduzione di un gene suicida, che porta alla rimozione selettiva di PSC indifferenziate da colture cellulari differenziate dopo il trattamento farmacologico;
- sviluppo di dispositivi di macro-incapsulamento, in grado di proteggere le cellule dall'attacco immune.

È stato dimostrato che è possibile originare iPSC umane da cellule somatiche. Per esempio, in modelli murini, le cellule ductali pancreatiche SOX9 positive possono comportarsi come potenziali progenitori delle isole pancreatiche e differenziarsi in  $\beta$ -cellule, in risposta a specifici stimoli. Questo filone di ricerca fa intravedere la possibilità che attraverso riprogrammazione e differenziazione cellulare possa essere ottenuta una quantità sufficiente di cellule  $\beta$  direttamente dal paziente stesso, suggerendo che nel futuro sarà possibile effettuare una terapia mediante infusione di cellule senza immuno-soppressione.

## 2. Rigenerare $\beta$ -cellule mediante trans-differenziazione di altre cellule pancreatiche non $\beta$

Diversi gruppi di ricerca si sono concentrati sulla rigenerazione di cellule  $\beta$  a partire dalla riprogrammazione diretta (trans-differenziazione) di altre cellule pancreatiche adulte non  $\beta$ , sia di origine endocrina che di origine esocrina, saltando lo stadio di pluripotenza. L'origine endodermica comune suggerisce che questi tipi di cellule potrebbero essere convertiti efficientemente in cellule  $\beta$  che producono insulina.

Studi su modelli animali hanno evidenziato che le  $\beta$ -cellule possono essere generate per esempio dalla **conversione di cellule alfa o cellule delta**. Inoltre, anche le **cellule acinari esocrine pancreatiche** possono essere riprogrammate a  $\beta$ -cellule dopo esposizione a specifici fattori di crescita.

Una prima metodica mediante la quale si può riprogrammare una popolazione cellulare è una **terapia genica**. La differenziazione da una linea cellulare a un'altra è regolata da specifici fattori di trascrizione: una strategia per attivare la trans-differenziazione, nei modelli murini, è riprogrammare l'espressione di una specifica combinazione di fattori di trascrizione delle sequenze geniche adeguate mediante trasduzione da parte di adeno-virus. Uno studio recente, per esempio, ha evidenziato che è possibile riprogrammare le cellule  $\alpha$  in cellule  $\beta$  funzionali attraverso l'inserzione forzata dei fattori di trascrizione PDX1 e MAF-A tramite un adeno-virus somministrato attraverso il dotto pancreatico del topo. Il trattamento ha normalizzato i livelli di glicemia in topi con diabete indotto chimicamente o spontaneo (topi NOD). Questi approcci presentano tuttavia limitazioni cliniche dovute all'uso di vettori virali. Per questo motivo, molti ricercatori si sono concentrati sull'induzione farmacologica della trans-differenziazione mediante la **sovra-espressione ectopica di fattori di crescita specifici**. Per esempio, l'*epidermal growth factor*, la nicotinamide, il *leukemia inhibitory factor* o il *ciliary neurotrophic factor* hanno riprogrammato *in vitro* le cellule acinari del ratto in cellule  $\beta$  in grado di ripristinare la normoglicemia nei topi diabetici. Recentemente, un gruppo giapponese ha mostrato che l'induzione dell'espressione ectopica del recettore di GLP-1, in combinazione con gastrina ed exendina-4, ha indotto la riprogrammazione di cellule acinari in cellule  $\beta$ .

Sono inoltre stati studiati alcuni farmaci o approcci nutrizionali in grado di stimolare la trans-differenziazione o la neogenesi  $\alpha$ /di  $\beta$ -cellule. In particolare, i **farmaci e gli approcci che potenzialmente potrebbero stimolare una trans-differenziazione** a  $\beta$ -cellule pancreatiche sono:

- **acido gamma-aminobutirrico (GABA):** è un neurotrasmettitore inibitorio del SNC, sintetizzato dalla glutammato-decarbossilasi (GAD). Il GABA promuove la replicazione  $\beta$ -cellulare, inibisce l'apoptosi  $\beta$ -cellulare, stimola la secrezione insulinica e sopprime il rilascio di glucagone da parte delle  $\alpha$ -cellule. Recentemente, uno studio condotto in un modello murino di diabete ha evidenziato che la prolungata esposizione a GABA induce neogenesi da  $\alpha$  a  $\beta$  cellule, aprendo la strada a studi clinici con composti a base di GABA. Inoltre, anche il trattamento *ex vivo* con GABA su isole umane trapiantate induce perdita di  $\alpha$ -cellule e incremento del numero di  $\beta$ -cellule. Tuttavia, i meccanismi mediati i quali avviene tale conversione sono ancora poco chiari;
- **artemisina:** è una piccola molecola anti-malarica, coinvolta nella repressione di un regolatore epigenetico noto come ARX e nel conseguente aumento della via di segnale di GABA. In uno studio l'artemisina ha portato a diminuzione della secrezione di glucagone da parte delle cellule  $\alpha$  e alla loro differenziazione in cellule che producono insulina. Un altro studio, però, pur confermando l'inibizione di ARX dopo il trattamento con artemisina, non ha rilevato nessuna conversione da cellula  $\alpha$  a cellula  $\beta$  nelle isole pancreatiche di topo. Questi risultati controversi hanno quindi generato incertezza sugli effetti di trans-differenziazione dovuti all'effetto del GABA;
- **terapia dietetica:** alcuni studi recenti hanno evidenziato che in modelli animali una dieta caratterizzata da basso contenuto di calorie, carboidrati e proteine è in grado di promuovere rigenerazione  $\beta$ -cellulare, inducendo ri-espressione di geni tipici dello sviluppo fetale nel pancreas adulto.

## CONCLUSIONI

Negli ultimi anni ci sono stati grandi progressi nella comprensione e nella valorizzazione di strategie rigenerative della massa  $\beta$ -cellulare. Gli approcci più promettenti riguardano la trans-differenziazione di cellule pancreatiche pre-esistenti e il reintegro di cellule  $\beta$  a partire da precursori. **Non è ancora chiaro in che misura queste metodiche possano essere applicate in vivo negli esseri umani**, ma sicuramente gli studi sui modelli murini hanno gettato le basi per l'ottimizzazione delle strategie più idonee e per l'individuazione di alcuni farmaci.

## BIBLIOGRAFIA

1. Aguayo-Mazzucato C, Bonner-Weir S. Pancreatic  $\beta$  cell regeneration as a possible therapy for diabetes. Cell Metab [2017, 27: 57-67](#).
2. Zhong F, Jiang Y. Endogenous pancreatic  $\beta$  cell regeneration: a potential strategy for the recovery of  $\beta$  cell deficiency in diabetes. Front Endocrinol [2019, 10: 101](#).