

Skickas till: info@stifud.se

Ev. artiklar och publikationer skickas till:

Stiftelsen Forskning utan djurförsök,

Gamla Huddingevägen 437, 125 42 Älvsjö

1. Anslagstagare Camilla Svensson	
Arbetsplats (fullständig postadress)	E-postadress
Inst för farmaceutisk biovetenskap, avd f toxikologi, Uppsala Universitet Box 594 751 24 Uppsala	Camilla.svensson@mpa.se
2. Projektnummer	Sista redovisningsdatum (se kontraktet)
42/06	080731
3. Projekttitel (svenska) Från stamcell till mogen T cell <i>in vitro</i> - utvärdering av ny metodik för studier av immuntoxiska ämnen	
4. Projektet <input type="checkbox"/> är avslutat <input checked="" type="checkbox"/> pågår utan fortsatt stöd från Stiftelsen Forskning utan djurförsök	
5a. Kortfattad beskrivning av projektet (syfte och utförande) ca 1 A4-sida Vårt immunsystem är beroende av funktionella T celler för att fungera. Utvecklingsprocessen från hematopoietisk stamcell till mogen T cell är dock mycket sårbar och ett antal olika faktorer, t ex exponering för vissa kemikalier och läkemedel, kan störa denna process. Konsekvenserna av denna immunsuppression är bl a en ökad risk för infektioner och vissa typer av cancer. Att kunna upptäcka och förstå hur sådan toxicitet uppstår är viktigt och utgör en förutsättning för att tillförlitliga risk/säkerhetsvärderingar av kemikalier/läkemedel ska kunna göras. Studier av denna typ av toxicitet har tidigare varit beroende av djurförsök. Syftet med detta projekt är att etablera en <i>in vitro</i> metod som kan användas för att identifiera och studera kemikaliers och läkemedels toxiska effekter på bildningen av T celler. Metoden bygger på att hematopoietiska stamceller kan stimuleras att utvecklas till T celler om de odlas tillsammans med en benmärgsderivat cellinje kallad OP9-DL1 (Schmitt and Zúñiga-Pflücker, 2002 and La Motte-Mohs <i>et al</i> , 2005). Utvecklingen till T celler är till väsentliga delar identisk med den som sker <i>in vivo</i> och de celler som mognar ut är funktionella. De stamceller vi använder tillvaratas från humant navelsträngsblod. Dessa celler odlas under 3-4 veckor tillsammans med OP9-DL1 celler i närvaro av olika testsubstanser. Effekten på tillväxt och T-cellsutveckling analyseras var 4:e dag med hjälp av flödescytometri, samtidigt tas celler tillvara för vidare analys av gen-och proteinuttryck. För att validera detta <i>in vitro</i> -systemets tillförlitlighet har vi valt att använda testsubstanser vars effekter på T-cellsutveckling är väldokumenterade <i>in vivo</i> : till att börja med har vi studerat dioxinen TCDD, Dietylstilbestrol, en syntetisk östrogen och industrikemikalien tributyltenn.	
5b. Ange nyckelord (max 6 st) hematopoietiska stamceller, immuntoxicitet, T celler, dioxiner, immunsuppression	
6. Kortfattad populärvetenskaplig beskrivning av de resultat som uppnåtts (bifoga gärna illustrationer, helst grafiska tekningar), ca ½ - max 1 A4-sida Immunsystemets främsta uppgift är att skydda oss mot inkräktande mikroorganismer. Detta sköts effektivt genom ett komplext samspel mellan olika celltyper och signalämnen och karakteriseras av förmågan att kunna känna igen och skilja mellan det som är kroppseget och främmande. Exponering för kemikalier i vår miljö kan rubba detta samspel och påverka vår hälsa. Om t ex förmågan att generera ett immunsvår hämmas, sk immunsuppression, ökar risken att drabbas av infektioner samt vissa former av cancer.	

Kännetecknande för många ämnen så kallade immuntoxiska ämnen är att de stör bildningen av T celler, en celltyp som har en nyckelroll i immunsystemet. Att kunna upptäcka och förstå hur sådan toxicitet uppstår är viktigt och utgör en förutsättning för att tillförlitliga riskbedömningar av kemikalier ska kunna göras. Tidigare har sådana studier krävt djurförsök, men vi använder oss av en nyutvecklade metod där människans T cellsutveckling kan studeras i cellkulturer. Metoden utgår från humana blodbildande stamceller som tas tillvara från navelsträngsblod. Dessa stamceller odlas sedan tillsammans med en cellinje som stimulerar stamcellerna att utvecklas till T celler. Med hjälp av denna metod kan olika substansers effekter på T-cellsutvecklingen enkelt studeras. Ett mål är att denna metod helt eller delvis ska kunna ersätta de djurbaserade tester som idag används för att upptäcka ämnen som stör bildning av immunförsvarets celler. Denna metod lämpar sig också väl för att närmare kunna undersöka vad det är som gör vissa ämnen så farliga för immunsystemet.

Vi har med stöd från Stiftelsen Forskning utan djurförsök initierat ett projekt som syftar till vidareutveckla metoden samt genom validering demonstrera att den utgör ett tillförlitligt och bra alternativ till djurstudier när effekter på T cellsutvecklingen ska utredas.

Vi har som en del av projektet provat fram en blandning av två odlingsmedier som gör att det går att reducera mängden fetalt kalvserum i kulturerna med 50 %. Detta är i sig en djurbesparande upptäckt. Vi har också påbörjat en validering av metoden där vi hittills hunnit testa tre olika substanser vars effekter på T cellsutvecklingen sedan är väldokumenterade genom studier på gnagare: dioxinen TCDD, den syntetiska östrogenen dietylstilbestrol samt kemikalien tributyltenn. Substanserna är också utvalda för att representera olika typer av verkningsmekanismer. Resultaten från dessa studier visar att den *in vitro* modell vi använder är en enkel och känslig metod för att upptäcka påverkan på T cellsutvecklingen och att det finns en samstämmighet i de effekter vi får med den nya *in vitro* modellen jämfört med vad som tidigare setts i djurförsök.

I projektets förlängning kommer vi att studera fler immuntoxiska substanser för att få en säker validering av metoden. Vi planerar också att använda tekniken för att studera närmare vad som händer på cellnivå och gennivå när människor och djur exponeras för dessa ämnen. Kunskapen vi får från dessa studier kan därefter användas för att utveckla en storskalig screeningsmetod som t ex kan användas för att förutsäga oönskade effekter hos kemikalier och läkemedel som vi exponeras för.

7. Sammanfattning av resultatens betydelse för att ersätta/begränsa djurförsök (ge gärna konkreta exempel)

Fortfarande används uteslutande *in vivo* tester på mus eller råtta när en substans påverkan på T cellsutvecklingen ska studeras (OECD guideline 407, EMEA ICH S8). Bedömningen av detta ingår som en del av den patologiska utvärdering som görs efter 28-dagars oral upprepade exponering av substansen på råtta. Effekter på T cellsutvecklingen studeras i regel med enkla metoder där vikt, cellularitet och histologi på tymus bestäms. Dessa 'endpoints' anses ge en tillförlitlig indikation på eventuell toxicitet men ger ingen information om bakomliggande mekanismer vilket i så fall kräver ytterligare användning av försöksdjur. Som konkret exempel använde vi ca 100-200 möss/år i ett tidigare projekt där vi mekanismerna bakom dioxin inducerad toxicitet studerades. Nu har vi i stor sett helt frångått djurförsök.

Den metod som vi vill introducera för användning vid immuntoxikologiska studier bygger på användning av humana hematopoitiska stamceller som tas tillvara från navelsträngsblod. Stamcellerna stimuleras att differentiera till T celler i cellkultur och det är enkelt att exponera de differentierande T-cellerna med olika substanser och studera effekterna av denna exponering i detalj.

En nackdel med metoden har varit att cellkulturerna kräver användning av fetalt kalvserum. Men vi har i detta projekt arbetat fram ett fungerande protokoll där vi reducerat mängden FCS i mediet från 20% till 10% genom att ersätta en del av det befintliga odlingsmediet med det serumfria Cellgro® SCGM (Cellgenix).

8. Vilket är den största framgången hittills i projektet?

Det har fram tills nu varit mycket tekniskt komplicerat att studera hur olika läkemedel och kemikalier påverkar människans immunsystem och i synnerhet vad som händer med T cellernas utveckling. Utvecklingen av denna metod har varit ett stort genombrott som förenklat studier av human T cellsutveckling och som innebär en möjlighet att begränsa användningen av försöksdjur inom både inom akademien och industrin. Vi har i detta projekt demonstrerat att metoden med fördel kan användas för att studera toxikologiska frågeställningar. De resultat som vi tror kommer att få störst genomslag är att vi för första gången direkt kunnat visa att människans T cellsutveckling är mycket känslig för exponering av det omdikterade miljögiftet TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin), något som tidigare bara kunnat visas i djurstudier.

9a. Beskrivning av vad som gjorts för att validera och sprida metoden/metoderna

För att validera metoden har vi valt ut substanser vars effekter på T cellsutvecklingen är väldokumenterade. Till att börja med har vi exponerat cellkulturerna med dioxinen TCDD, den syntetiska östrogenen dietylstilbestrol samt kemikalien

tributyltinn. För dessa substanser har vi även data sedan tidigare från *in vitro* T cellsdifferentieringsförsök med murina hematopoietiska stamceller, vilket gör det enklare att jämföra resultaten från djurstudier med vår metod. Vi planerar också att utöka valideringen med ytterligare immuntoxiska substanser bl a läkemedlen dexametason och cyklosporin A. Metoden har redan fått god spridning bland immunologer med intresse för hematopoies och T cellsbiologi. Jag har genom att delta i internationella toxikologikonferenser gjort mitt bästa för att sprida metoden bland toxikologer. Jag har även presenterat metoden för toxikologer på livsmedelsverket som även bidragit med substanser för validering av metoden.

9b. Vad mer skulle behöva göras för att metoden/metoderna ska bli spridda och praktiskt användbara?

Genom att även i fortsättningen aktivt delta i konferenser och på möten med toxikologisk inriktning, samt genom publicering i vetenskapliga tidskrifter hoppas jag att metoden ska få genomslag i den toxikologiska världen.

Vad gäller användbarheten så bedömer jag den som god. Det finns ett flertal protokoll publicerade som beskriver hur metoden sätts upp och det är relativt enkelt att få metoden att fungera förutsatt att grundläggande kompetens i cellodling finns. Det finns dock behov av ett metodprotokoll som tar upp toxikologiska aspekter och jag planerar därför att skriva och publicera ett sådant.

10. Förteckning över publikationer som projektet resulterat i

Inga resultat finns för närvarande publicerade men det de resultat vi fått fram kommer att utmynna i minst två olika publikationer . Det första manuskriptet behandlar användningen av metoden för studier av effekter på human T cellsutveckling och resultatet från valideringen. Det andra manuskriptet presenterar de spännande data vi har angående effekterna av TCDD på human T cellsutveckling och mekanismerna bakom denna effekt.

11a. Kortfattad vetenskaplig rapport (abstract) på engelska (projektitel, syfte, utförande, och resultat), ca ½ A4-sida

From stem cell to T cell *in vitro* - optimization and validation of a new method for studying immunotoxicity

Aims:

The overall aim for our research is to improve the means to predict immunotoxicity. The specific aims of this project were to optimize and validate the *in vitro* OP9-DL1 system for human T cell differentiation as a model to identify and study potentially immunotoxic substances.

Method:

The system of *in vitro* human T cell development was originally developed by Juan Carlos Zúñiga-Pflücker and co-workers (Schmitt and Zúñiga-Pflücker, 2002 and La Motte-Mohs et al, 2005). In this cell culture system, human cord-blood derived hematopoietic stem cells are co-cultured on a monolayer of the cell line OP9-DL1 (a bone marrow derived stromal cell line modified to express the Notch-ligand Delta-like 1) in the presence of the cytokines Flt-3L and IL-7. The cultures were passaged every 4th day and T cell development analysed at day 2, 7, 16, 23 and 30 by flow cytometric analysis of cell surface antigens specific for different stages of T cell development (e.g. CD34, CD7 and CD1a present on early T cell progenitors and CD4 and CD8 which appear at later stages of T cell development).

Results:

In the existing protocols for *in vitro* human T cell differentiation it is recommended that 20% fetal calf serum is used in the co-cultures in order to support T cell maturation. With support from the Swedish fund for research without animal experiments we have as a first step optimized the cell culturing conditions and shown that by mixing the original media with an equal part of the serum-free media Cellgro® SCGM (Cellgenix) the amount of FCS can be reduced by at least 50% without affecting the stem cell differentiation or the viability of the OP9-DL1 stromal cells.

In the validation step we have tested three substances known to interfere with T cell development in experimental animals: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin, tributyltin chloride and diethylstilbestrol.

For each test substance, an initial pilot experiment was made to determine the appropriate dose-range for a full scale experiments. Based on this pilot experiment two different concentrations plus vehicle control was chosen.

TCDD: Significant inhibition of T cell differentiation was observed at doses as low as 0.01 nM TCDD already at day 7 of co-culture indicating that TCDD targets early T cell development. Similar inhibition of T cell development has previously been described using a murine *ex vivo* culture system where fetal thymus lobes are cultured in the presence of TCDD, but at 100 fold higher doses.

Diethylstilbestrol: Diethylstilbestrol was also able to inhibit T cell development but at a later stage of development compared to TCDD and at doses $\geq 25 \mu\text{M}$. These results were also in accordance with data from *in vivo* exposed mice.

Tributyltin: Exposure of the co-cultures to tributyltin appeared to be toxic to both hematopoietic and stromal cells at concentrations above $2.5 \mu\text{M}$. It has been described previously that this compound may have a general toxic effect by causing a disturbance in redistribution of the cytoskeleton.

The current opinion is that the OP9 stroma is relatively resistant to chemical treatment. However, the results from the experiments with tributyltin clearly demonstrates that some compounds may act directly or indirectly on the OP9 stroma. Therefore it is important to examine possible effects of the test compound on the stroma itself as part of the validation process. This can be done by measuring cell proliferation and analyze cell morphology of the OP9-DL1 cells in separate cultures.

11b. Bifoga eventuellt en vetenskaplig rapport på engelska, max 4 sidor (syfte, utförande, och resultat)