

a cura di Gloria Formoso

Dipartimento di Medicina e Scienze dell'Invecchiamento;
Center for Advanced Studies and Technology-CAST, Università degli Studi "G. d'Annunzio", Chieti-Pescara

Verso una nuova fonte di β -cellule per la cura del diabete mellito di tipo 1 • Towards a new source of β -cells for the cure of type 1 diabetes

Valentina Zamarian, Silvia Pellegrini,
Valeria Sordi

Diabetes Research Institute, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2202h>

ABSTRACT

Pluripotent stem cells are the best candidates for a renewable and infinite source of β -cells suitable for a future application in cell therapy for type 1 diabetes. Obtaining a cellular product that is safe and functional is becoming urgent, as the first clinical trials using stem cell-derived β cells are ongoing. This review summarizes the current strategies applied in the field of stem cell derived- β cells to improve in vitro differentiation and to solve the problems of tumorigenicity and immune rejection for a future stem cell based cell therapy.

KEYWORDS

iPSC, ESC, β -cell, differentiation, type 1 diabetes, cell therapy.

INTRODUZIONE

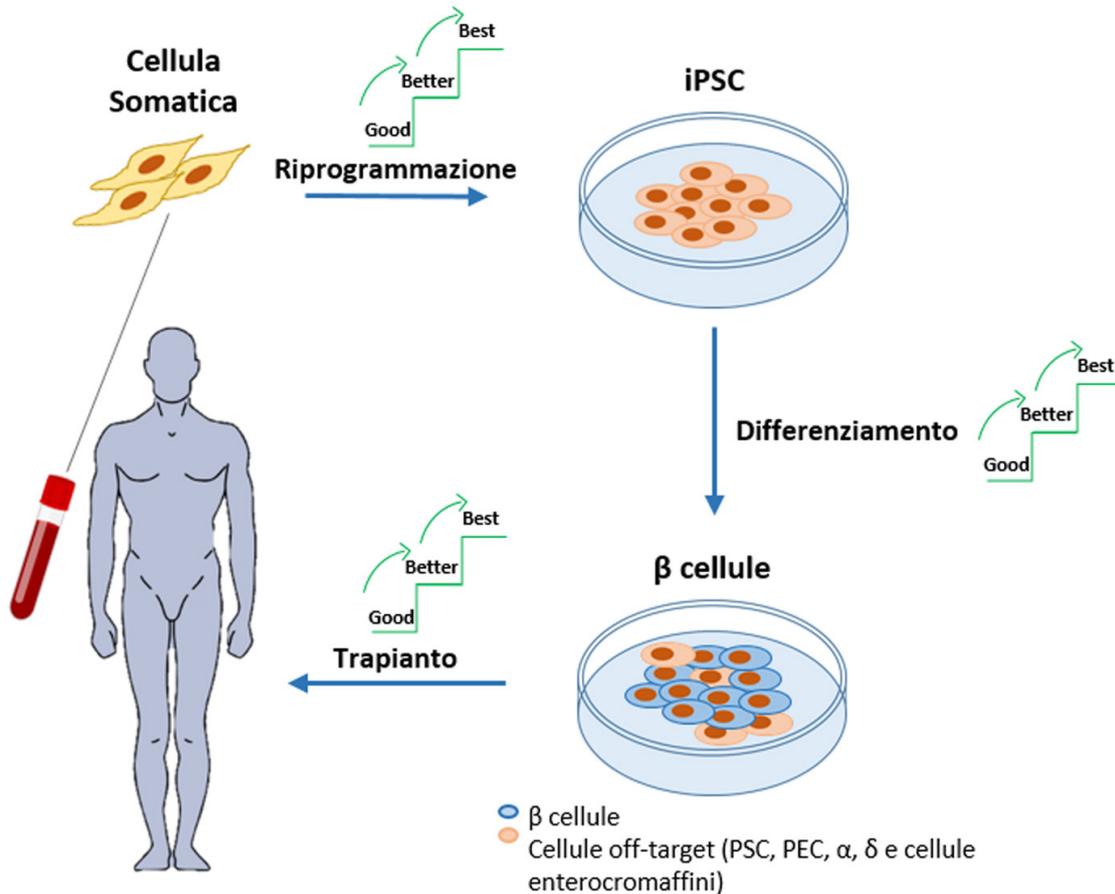
Il Diabete Mellito di Tipo 1 (DMT1) è una malattia autoimmune che porta alla completa perdita delle β -cellule produttrici di insulina a causa di un attacco da parte del sistema immunitario. La terapia insulinica associata all'utilizzo dei più moderni sensori di monitoraggio continuo del glucosio permette un controllo fine della glicemia (1), ma non protegge il paziente da complicanze a lungo termine quali nefropatia, angiopatia, retinopatia, ictus e infarto (2). Il trapianto di pancreas o di isole da donatore d'organo è un approccio che permette di riportare i livelli di glicemia nella norma e ridurre il rischio di complicanze (3). Nel trapianto di isole, il pancreas del donatore viene digerito e le isole vengono disgregate (4) per

poi essere trapiantate, tramite infusione in vena porta, nel paziente ricevente. Questo approccio è però limitato dalla scarsità dei donatori d'organo e dalla necessità di sottoporre il paziente a una terapia immunosoppressiva a vita (5-6).

Queste limitazioni potrebbero essere superate utilizzando le cellule staminali come una nuova fonte infinita di β -cellule. Una cellula staminale pluripotente (PSC) ha il potere di auto-rinnovarsi e di poter diventare qualsiasi cellula somatica del corpo, compresa la β -cellula. Ci sono due principali fonti di cellule staminali pluripotenti, le cellule staminali embrionali (ESC) e le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC). Mentre le ESC derivano dalla massa cellulare interna della blastocisti, le iPSC derivano dalla riprogrammazione di cellule somatiche adulte tramite l'espressione forzata di quattro fattori di trascrizione (7). I vantaggi principali dell'utilizzo delle iPSC rispetto alle ESC, è che non hanno implicazioni etiche che ne limitino l'utilizzo e che, derivando da cellule somatiche adulte, potrebbero essere utilizzate per una terapia autologa (7). Idealmente infatti, le iPSC potrebbero essere generate da una cellula somatica adulta (del sangue, della pelle) di un paziente con DMT1, differenziate poi in cellule produttrici di insulina e trapiantate nello stesso soggetto (Fig. 1). In questo articolo andremo a trattare le attuali criticità presenti nei protocolli di differenziazione per la produzione di β -cellule mature e funzionali da ESC e iPSC, parleremo inoltre della loro possibile appli-

Figura 1 ◆ Schema di terapia autologa con iPSC.

Le cellule somatiche del paziente vengono riprogrammate in iPSC e differenziate in vitro in β -cellule per poi essere trapiantate nello stesso paziente. Si stanno apportando continui miglioramenti al processo di riprogrammazione, di differenziamento e nell'ottenimento di un prodotto cellulare migliore e più sicuro per il trapianto. iPSC=cellula staminale pluripotente; PEC=precursore pancreatico



cazione in una terapia cellulare per il DMT1 affrontando i problemi relativi alla sicurezza del prodotto cellulare finale e del rigetto immunitario. L'ottenimento di un prodotto cellulare il più possibile sicuro e funzionale sta diventando impellente considerando lo sviluppo dei primi studi clinici (NCT03163511, NCT02239354 e NCT04786262) condotti trapiantando le β -cellule derivate da ESC in pazienti con DMT1 (8-9). Nel 2006, la scoperta delle iPSC ha aperto nuove possibilità per l'utilizzo di cellule pluripotenti nelle terapie cellulari (10). iPSC e ESC hanno molte caratteristiche comuni, tra cui morfologia, pluripotenza, auto-rinnovamento e profili di espressione genica. Dal punto di vista del potenziale di differenziamento, sia le ESC sia le iPSC hanno la capacità di differenziarsi in cellule appartenenti ai tre foglietti embrionali, ectoderma, mesoderma ed endoderma. Le due tipologie di staminali

pluripotenti presentano entrambe svantaggi e vantaggi, rendendo difficile la previsione su quale sarà la fonte di cellule pluripotenti migliore per una futura applicazione nella terapia cellulare del diabete (11). Ad oggi, nessun studio clinico è stato ancora condotto con β -cellule derivate da iPSC nel campo del diabete.

DIFFERENZIAMENTO IN VITRO DI CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI IN β -CELLULE PANCREATICHE

I protocolli di differenziamento pancreatico descritti fino ad oggi mimano in vitro le fasi dello sviluppo del pancreas embrionale passando dagli stadi di endoderma definitivo, intestino primitivo, endoderma pancreatico (o progenitore endocrino) fino allo stadio di β -cellula matura (Fig. 2).

I primi tentativi di differenziamento verso lo stadio di endoderma definitivo sono stati condotti da D'Amour e colleghi, che nel 2005 per la prima volta sono stati in grado di ottenere cellule di endoderma definitivo da ESC, utilizzando l'Activina A, un membro della superfamiglia TGF- β , che come Nodal è essenziale per il differenziamento in endoderma (12). Nel 2006 fu ottenuta per la prima volta una cellula insulina positiva differenziata in vitro da ESC (13) e due anni più tardi, nel 2008, furono ottenute le prime cellule in grado di secernere insulina in vivo (14). Ogni protocollo di differenziamento si basa sull'utilizzo di specifiche citochine e modulatori del segnale che vanno ad attivare o inibire *pathways* chiave dello sviluppo del pancreas embrionale, come per esempio *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), *WNT*, *Fibroblast Growth Factors* (FGF), *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) e *Notch* (13, 15-16). Nel 2014 Melton e colleghi riportano per la prima volta un protocollo di differenziazione 3D in vitro in larga scala, in grado di generare centinaia di milioni di β -cellule da ESC. Queste nuove β -cellule (denominate SC- β) esprimono marcatori tipici delle β -cellule mature (PDX1, NKX6.1, C-Peptide), immagazzinano correttamente l'insulina in granuli secretori e secernono quantità di insulina in risposta al glucosio paragonabili alle β -cellule adulte. Inoltre, queste cellule trapiantate in un modello murino sono in grado di secernere insulina, migliorando l'iperglicemia nei topi diabetici entro 2 settimane dal trapianto (15). L'efficienza del protocollo di differenziamento è in continua ottimizzazione per riuscire ad ottenere una percentuale sempre maggiore di β -cellule avente una funzione il più simile possibile a una β -cellula matura, questo anche perché i primi protocolli di differenziamento condotti su linee di ESC portavano ad un differenziamento meno efficiente quando applicato alle iPSC (17). Ancora oggi, infatti, si sta lavorando sull'efficienza di differenziamento in quanto risulta ancora molto variabile fra laboratori e linee cellulari diverse, con un'efficienza massima descritta del 70% di cellule C-peptide positive (18). Inoltre va tenuto conto che queste cellule possono includere sia cellule funzionali (NKX6.1⁺/C-Peptide⁺) sia cellule poliormonali non funzionali (Glucagone⁺/C-Peptide⁺ e Somatostatina⁺/C-Peptide⁺) (17). Tra gli altri prodotti cosiddetti *off-target* del differenziamento sono state identificate anche cellule endocrine mature come cellule α e δ , cellule enterocromaffini (19) e cellule progenitrici

pancreatiche che non hanno raggiunto la completa maturazione.

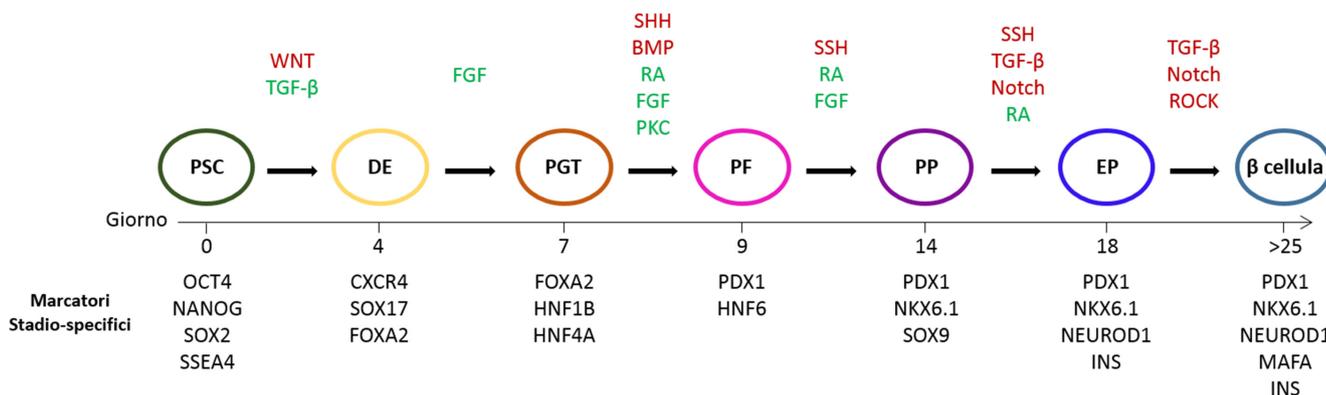
Gli studi sulle cellule progenitrici pancreatiche derivate da ESC e iPSC hanno dimostrato come queste possano ultimare la loro maturazione in vivo, una volta trapiantate in topi immunodeficienti diabetici (20-21). Ciononostante, il miglioramento dell'efficienza del differenziamento per generare percentuali più elevate di β -cellule in vitro, rimane una sfida importante al fine di poter trapiantare cellule sempre più pure mature e, di conseguenza, sicure. Per migliorare gli attuali protocolli di differenziamento si sta lavorando su diversi approcci, tra cui l'utilizzo di proteine della matrice extracellulare quali laminina, collagene e fibronectina come base di coltura per le cellule in differenziamento (22) o l'utilizzo di cellule di supporto come le cellule endoteliali (23) o le cellule mesenchimali (24): i fattori del microambiente pancreatico possono imitare le condizioni in vivo per promuovere il differenziamento in vitro.

Un altro campo di studio è la ricerca di nuove molecole che favoriscano il differenziamento o la maturazione della β -cellula. Un recente studio ha ad esempio portato alla luce l'importanza di una corretta attivazione del *pathway* di mTOR, fondamentale per istruire le β -cellule a rispondere in modo corretto al glucosio. Infatti, un'iperattivazione costante nel tempo di questo *pathway* porta a secrezione di insulina difettosa, stress del reticolo endoplasmatico e ridotta sopravvivenza delle β -cellule. Perciò, l'inibizione di questo *pathway* negli ultimi stadi del differenziamento, utilizzando molecole come il Tacrolimus e la Rapamicina, potrebbe migliorare la sopravvivenza e la funzionalità delle β -cellule (25). Un altro *pathway* importante per la generazione e la maturazione delle β -cellule è quello di ROCKII, un inibitore della chinasi associata a Rho; è stato infatti dimostrato come l'inibizione di ROCKII con la molecola H1152 porti ad ottenere delle β -cellule derivate da PSC con una migliore capacità di risposta allo stimolo di glucosio e in grado di normalizzare la glicemia dopo trapianto in un topo diabetico (26).

Attualmente, sono sempre più diffusi la coltura e il differenziamento di ESC e iPSC in tre dimensioni (3D) all'interno di bioreattori, con lo scopo di mimare l'architettura e la morfologia delle isole (27) e ottenere un maggior numero di β -cellule. Il differenziamento delle PSC può essere condotto completamente in 3D (15) oppure può essere condotto in piastre 2D fino allo stadio di precursori

Figura 2 ♦ Protocollo di differenziamento che segue le fasi dello sviluppo del pancreas embrionale da PSC in cellula insulina positiva.

Il protocollo è suddiviso in 7 stadi nei quali vengono aggiunte specifiche citochine e modulatori del segnale coinvolti nell'attivazione (verde) o nell'inibizione (rosso) di specifici pathways. PSC=cellula staminale pluripotente; DE=endoderma definitivo; PGT=primitive gut tube, intestino primitivo; PF= posterior foregut, intestino anteriore posteriore; PP=pancreatic progenitor, precursore pancreatico; EP=endocrine progenitor, progenitore endocrino; WNT=Wingless/Integrated signaling pathway; TGF- β =transforming growth factor β ; SHH=sonic hedgehog; FGF=fibroblast growth factor; BMP=bone morphogenic protein; RA=retinoic acid; PKC=protein kinase C; Notch= Notch signaling pathway; ROCK=Rho-associated protein kinase



pancreatici per poi essere trasferito in 3D nell'ultima fase del differenziamento in β -cellule (28).

LA SICUREZZA DELLE β -CELLULE DERIVATE DA CELLULE STAMINALI NELL'UOMO

La terapia cellulare con β -cellule derivate da PSC si sta già applicando nei primi studi clinici. La sicurezza relativa al prodotto cellulare finale prima dell'impianto assume quindi un'importanza cruciale. Uno dei potenziali ostacoli da superare è quello legato alla tumorigenicità delle PSC (29-30). Caratteristica intrinseca delle cellule pluripotenti infatti è la capacità di generare teratomi in seguito a trapianto, quindi la presenza anche solo di una cellula non completamente differenziata all'interno della popolazione cellulare da trapiantare potrebbe esporre al rischio di formazione di teratomi in vivo (29-30). Al fine di aumentare la sicurezza delle β -cellule derivate da iPSC dal punto di vista del loro potenziale tumorale si sta lavorando su diversi potenziali approcci:

1. *Metodo di riprogrammazione più sicuro delle cellule somatiche in iPSC.* Le iPSC possono essere riprogrammate da qualunque cellula somatica adulta e questo processo è stato inizialmente ottenuto mediante l'over-espressione di quattro fattori di trascrizione (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc, i "fattori di Yamanaka") mediante l'utilizzo

di vettori retrovirali (10,31). Il grande svantaggio di questo metodo è che i vettori retrovirali si integrano casualmente nel genoma della cellula, portando a un potenziale rischio di mutagenesi inserzionale e di instabilità genomica (32-33). Negli anni questo problema è stato superato utilizzando metodi alternativi di espressione dei fattori di Yamanaka che non prevedono l'integrazione dei fattori di riprogrammazione all'interno del genoma. Attualmente, i migliori metodi per ottenere iPSC in maniera efficiente e sicura sono i vettori episomali (efficienza dello 0.0006-0.02%) e il Sendai virus (efficienza dello 0.5-1.4%) (34,35). Recentemente è stata anche messa a punto una tecnica di riprogrammazione chimica di cellule somatiche in iPSC che potrebbe permettere la loro applicazione in clinica senza i rischi legati all'utilizzo di vettori o plasmidi, anche se non integranti (36).

2. *Selezione di cellule pancreatiche differenziate.* Un'altra possibilità per aumentare la sicurezza delle β -cellule ottenute da iPSC consiste nella selezione delle cellule differenziate o nella selezione negativa delle cellule pluripotenti residue che si vogliono eliminare. La selezione positiva utilizza anticorpi che legano proteine specifiche espresse sulla superficie delle cellule pancreatiche e può avvenire a diversi stadi del

differenziamento, dai progenitori dell'endoderma pancreatico (PE) alle β -cellule mature, ma attualmente non sono ancora stati trovati dei marcatori di superficie universalmente condivisi. Negli ultimi anni sono stati proposti molti marcatori, tra cui CD24(37), CD200 e CD318 (38) per le cellule endocrine mature, e CD142 per i progenitori pancreatici, ma nessuno di questi ha avuto seguito in studi successivi. Uno dei marcatori di superficie più promettenti è la glicoproteina 2 (zymogen granule membrane GP2), identificata tramite analisi di espressione genica (39) e di proteomica (40). La selezione tramite GP2 è stata utilizzata per l'isolamento dei progenitori pancreatici PDX1⁺/NKX6-1⁺ derivati da PSC (40). Il differenziamento dei progenitori pancreatici GP2⁺ è correlato ad una migliore efficienza di differenziamento e alla formazione di cellule insulino positive più responsive al glucosio (39). Nel 2019 Veres e colleghi hanno identificato mediante analisi di trascrittomica il marcatore di superficie CD49a/ITGA1. La selezione delle cellule CD49⁺ e loro riaggregazione ha permesso di ottenere aggregati che contenevano fino all'80% di β -cellule derivate da PSC. Queste cellule erano più funzionali e reattive allo stimolo di glucosio in vitro rispetto a quelle non selezionate per il CD49a (41). In ultimo, un recente lavoro ha riportato l'utilizzo di tre anticorpi monoclonali, denominati 4-2B2, 4-5C8 e 4-5G9, specifici per l'identificazione delle cellule positive all'insulina derivate da PSC. Questo approccio ha permesso di ottenere cluster di cellule simili a isole con una migliore capacità di risposta al glucosio (42). Queste strategie potrebbero permettere la produzione su larga scala di β -cellule derivate da PSC più pure, funzionali e potenzialmente sicure.

3. *Eliminazione delle PSC contaminanti dal prodotto finale.* La strategia di selezione mediante anticorpi diretti contro marcatori specifici può essere utilizzata anche in negativo, andando a sfruttare l'espressione di marcatori specifici delle cellule pluripotenti per eliminarle dal prodotto finale. Anticorpi contro l'antigene (TRA)-1-60 e TRA-1-81 o gli antigeni embrionali specifici (SSEA), come SSEA-3, SSEA-4 (43) e SSEA-5 (44) sono stati utilizzati per selezionare negativamente le PSC all'interno di popolazioni cellulari di cellule differenziate, ma la selezione mediante citometria a flusso non assicura una completa eliminazione

delle PSC e la procedura di selezione potrebbe impattare sulla vitalità delle cellule differenziate. Per questo motivo l'utilizzo di anticorpi è stato associato ad agenti citotossici che in seguito al legame dell'anticorpo portano alla morte delle PSC direttamente nelle piastre di coltura (45-49). Anche se gli approcci presenti in letteratura si sono dimostrati più o meno efficaci nell'eliminazione delle PSC, quasi nessuno è stato sperimentato sulle β -cellule derivate da PSC per la terapia cellulare del diabete. Recentemente è stato pubblicato uno studio interessante riguardante un nuovo metodo utilizzato per eliminare le PSC residue da una coltura di cardiomiociti differenziati. Nello specifico, il coniugato anticorpo-farmaco anti-CD30 Brentuximab Vedotin è stato utilizzato per uccidere selettivamente le cellule iPSC, che esprimono alti livelli di CD30 (50). Recentemente abbiamo applicato questa strategia nel campo del diabete, confermando che il trattamento con Brentuximab Vedotin induce efficacemente la morte cellulare nelle iPSC residue dopo il processo di differenziamento, non intaccando l'identità e la funzionalità delle β -cellule differenziate. L'efficacia di questa strategia è stata confermata anche in vivo, infatti il trapianto di β -cellule derivate da iPSC trattate con Brentuximab Vedotin prima del trapianto non ha portato alla formazione di teratomi. Questi risultati dimostrano come strategie di eliminazione selettiva delle cellule pluripotenti possano ridurre il potenziale tumorale delle PSC contaminanti, migliorando la sicurezza delle β -cellule (51).

4. *Controllo delle cellule tumorali tramite l'editing genetico con l'inserimento di un gene suicida.* L'editing genetico è una nuova strategia utilizzata per controllare il prodotto cellulare finale, anche dopo il trapianto, dotando le cellule di un gene suicida in grado di eliminare al bisogno le PSC residue e le cellule differenziate che potrebbero subire una trasformazione maligna in vivo (52). In generale, per l'editing delle PSC, deve essere scelto un vettore in grado di fornire un inserimento stabile ed efficiente del costrutto, in quanto il gene inserito deve poter essere mantenuto nello stato pluripotente, nella progenie, durante il differenziamento e nello stadio finale. Inoltre, non deve andare incontro a silenziamento, riduzione dell'espressione o modifiche dovute a mutazioni. I geni suicidio più comunemente usati svolgono la loro funzione attra-

verso un'attività enzimatica di conversione di un farmaco in un composto tossico. Qadir e colleghi hanno applicato questo approccio nel campo delle β -cellule derivate da PSC tramite un doppio approccio "fail-safe", in grado sia di uccidere la frazione residua di PSC, sia di selezionare le cellule produttrici di insulina. In particolare, hanno utilizzato come gene suicida la timidina chinasi del virus herpes simplex (HSV-TK) posta sotto il promotore della trascrittasi inversa della telomerasi (*hTERT*), altamente espresso solo dalle cellule staminali e dalle cellule tumorali. Questo ha permesso la morte selettiva delle PSC dopo l'esposizione al Ganciclovir (GCV). Allo stesso tempo, la nitroreductasi associata a *E. Coli* (NTR) è stata utilizzata per selezionare le cellule positive all'insulina. Poiché questo costrutto è affiancato da siti *loxP*, ed è eliminato dall'espressione di Cre posto sotto il controllo del promotore dell'insulina umana, le cellule che esprimono l'insulina sono rese insensibili al profarmaco CB1954. Utilizzando questo metodo solo le cellule insulino-positive e non proliferanti sopravvivono alla selezione, e le cellule che possono de-differenziarsi dopo il trapianto possono ancora essere selettivamente uccise in vivo dal GCV (53). Un'altra possibilità consiste nella possibilità di indurre l'apoptosi specificatamente nelle PSC, sfruttando l'espressione di geni legati all'apoptosi specifici delle PSC (54) oppure utilizzando promotori altamente espressi nelle PSC come *TERT*, *OCT4*, *TERF1* o *NANOG* (55-58). In conclusione, l'editing genetico è un approccio promettente per controllare i prodotti cellulari derivati dalla PSC, in particolare per l'eliminazione di cellule con potenziale tumorale in vitro e per poter intervenire tempestivamente in caso di insorgenza di tumori in vivo. Tuttavia, va tenuto presente che l'editing genetico può causare mutazioni o il silenziamento di geni endogeni, e che questo potrebbe portare alla morte della cellula o promuovere la sua trasformazione tumorale (59).

IMMUNITÀ

Un altro grande limite da superare prima di potere applicare efficacemente in clinica la terapia con β -cellule derivate da PSC consiste nel rigetto delle cellule trapiantate, dovuto all'incompatibilità HLA delle β -cellule deri-

vanti da PSC di un donatore. Inoltre, poiché le tecniche di riprogrammazione e la coltura prolungata in vitro potrebbero portare all'acquisizione di nuovi antigeni, le β -cellule potrebbero suscitare una risposta di rigetto indipendentemente dalla compatibilità HLA iniziale (60-61). Va inoltre considerato che nel campo del diabete di tipo 1 il problema del rigetto persisterebbe anche nel caso di una terapia autologa di β -cellule derivate da iPSC dello stesso donatore, per via della risposta autoimmune. Attualmente il problema del rigetto viene controllato con farmaci immunosoppressori, che però presentano tossicità diretta sulla β -cellula e possono avere effetti collaterali anche gravi nei riceventi (62). Di seguito verranno descritti i principali potenziali approcci utilizzati per prevenire il rigetto immunitario dopo il trapianto.

1. *Tecniche di incapsulamento del prodotto cellulare per prevenire la risposta immunitaria.* I sistemi di incapsulamento sono stati proposti come soluzione per proteggere fisicamente le cellule dal sistema immunitario, ma possono essere sfruttati anche come sistema di sicurezza, in quanto possono essere rimossi in caso di formazione di tumori. L'incapsulamento consiste nella protezione fisica delle cellule con una struttura semi-permeabile in grado di proteggere le cellule dal sistema immunitario, ma nello stesso tempo consentire il passaggio di nutrienti, ossigeno e insulina. Diversi studi hanno applicato il metodo dell'incapsulamento nel trapianto di isole per la cura del DM1 ed esistono due metodi principali, il micro- e il macro-incapsulamento. Il micro-incapsulamento consiste nel racchiudere le isole in capsule, solitamente di alginato, in rapporto 1:1, mentre nel macro-incapsulamento si include tutto il preparato cellulare in un unico dispositivo; nel primo caso lo scambio di nutrienti e ossigeno è migliore grazie ad un rapporto superficie/volume più elevato (63-64). Tra i sistemi di macro-incapsulamento (65-67), il dispositivo TheraCyte™ è composto da una membrana esterna che facilita la vascolarizzazione e una membrana immunoprotettiva interna ed è stato utilizzato per studiare la risposta allogenica inizialmente nel modello sperimentale di ratto. Ai ratti è stato impiantato sottocute il dispositivo vuoto, dopo 3 mesi dall'impianto è stato indotto il diabete e all'interno del dispositivo sono state inserite 1000 isole di ratto da donatore. I dati hanno mostrato che il dispositivo è in grado di

proteggere le isole dalla risposta immune a 6 mesi dopo il trapianto. Un aspetto negativo del dispositivo è che a 6 mesi dal trapianto ha mostrato segni di fibrosi al suo interno, che può portare a una perdita del graft a lungo termine. Un sistema di macro-incapsulamento molto simile a Theracyte, denominato Encaptra, è quello attualmente utilizzato nelle sperimentazioni cliniche di β -cellule derivate da ESC (8-9). L'alternativa è l'utilizzo di sistemi di micro-incapsulamento, una tecnologia applicata per la prima volta 42 anni fa, quando è stato dimostrato che le isole incapsulate e trapiantate in un modello di ratto diabetico erano in grado di migliorare il diabete per 2-3 settimane (68). I dispositivi di incapsulamento tuttavia, possono portare allo sviluppo di una risposta da corpo estraneo, alla formazione di una capsula fibrotica attorno al trapianto e alla conseguente morte delle isole per ipossia (69). Successive modifiche alle dimensioni delle capsule e l'utilizzo di nuovi biomateriali hanno migliorato la biocompatibilità prolungando la durata e la funzionalità del trapianto (70-72). Vegas e colleghi hanno mostrato come β -cellule derivate da PSC incapsulate in alginato di biossido di triazolo-tiomorfina siano in grado di ripristinare la glicemia in topi diabetici immunocompetenti in assenza di immunosoppressione e 174 giorni dopo il trapianto le β -cellule mostravano ancora reattività al glucosio (72). Tuttavia, ulteriori miglioramenti sono necessari per permettere una stabilità e una funzionalità a lungo termine del prodotto trapiantato.

2. *Editing delle cellule per renderle meno immunogene.* Una strategia su cui si sta investendo tantissimo nel campo in questi ultimi anni è cercare di modificare l'espressione delle proteine di superficie delle cellule in modo da renderle invisibili al sistema immunitario. Uno degli approcci più utilizzati consiste nella delezione del gene beta-2-microglobulina (B2M) che permette di generare cellule che non esprimono l'HLA di classe I, in modo da renderle meno immunogeniche in quanto non riconoscibili dalle cellule dell'immunità adattativa (73). Un'ulteriore modifica può essere fatta eliminando anche il gene CIITA che codifica per l'HLA di classe II (74). La rimozione dell'HLA protegge le cellule dall'attacco dei linfociti T CD8+, ma l'assenza di espressione di HLA determina l'attivazione delle cellule dell'immunità innata, in particolare le

cellule NK. A questo scopo molti gruppi stanno lavorando sull'introduzione di fattori immunomodulatori quali PD-L1 (75), HLA-E (76) o HLA-G (77), che inducono tolleranza contro le cellule NK, oppure molecole come CD47, che impedisce la fagocitosi della cellula da parte del macrofago (78).

In un recente studio è stato dimostrato come le β -cellule derivate da PSC in un ambiente infiammatorio sovra esprimano l'HLA-I come accade nelle β -cellule umane e come queste siano in grado di innescare una risposta HLA-I che stimola i linfociti T CD8+ contro le β -cellule. L'editing delle β -cellule derivanti da PSC ha dimostrato come l'assenza di espressione in membrana dell'HLA-I e la sovra espressione di PDL-1 fossero in grado di ridurre la risposta immunitaria CD8+ specifica (79).

PRIMI STUDI CLINICI CON β -CELLULE DERIVATE DA ESC

Grazie ai suoi studi pionieristici sul differenziamento di ESC in β -cellule, i ricercatori di Viacyte Inc (<https://viacyte.com/>) sono stati i primi a condurre studi clinici trapiantando dei precursori pancreatici (PEC, cellule PDX1+/NKX6.1+) derivati dal differenziamento di ESC in pazienti con T1D. L'approccio utilizzato da Viacyte è stato quello di trapiantare sottocute in assenza di immunosoppressione un prodotto, denominato PEC Encap, o VC-01) composto da delle cellule progenitrici pancreatiche incapsulate in un dispositivo (Encaptra) che permettesse lo scambio di nutrienti, glucosio, ossigeno e ormoni, e consentisse la maturazione in vivo dei progenitori in β -cellule funzionali. Sfortunatamente, questo metodo di incapsulamento ha portato allo sviluppo di una forte reazione fibrotica intorno al dispositivo che ha determinato un'elevata morte delle cellule pancreatiche al suo interno, nella maggior parte dei pazienti trapiantati. Per questo motivo Viacyte ha deciso di sviluppare un secondo prodotto (PEC-Direct, VC-02) composto da PEC e un dispositivo di incapsulamento che presenta dei microfori che permettono la vascolarizzazione delle cellule incapsulate per migliorarne l'attecchimento; di conseguenza questa strategia necessita di una terapia immunosoppressiva. I due studi che riportano i dati ottenuti su 15 e 17 pazienti con T1D in seguito al trapianto di VC-02 nel sottocute hanno dimostrato la presenza, a 6 e 12 mesi dal trapianto, di una piccola quantità (5-30 pM) di C-peptide in circo-

lo in risposta al pasto. Anche se la quantità di C-peptide rilevata era bassa rispetto alla quantità che servirebbe ad ottenere l'insulino indipendenza (1000-1500 pM), questi dati sono la prima evidenza riportata di secrezione di insulina regolata dai pasti da parte di cellule staminali differenziate nei pazienti. L'analisi istologica dei dispositivi ha rivelato la presenza, di α e β -cellule mature (8-9). Inoltre le cellule sono stati ben tollerate e non si è osservata alcuna formazione di teratomi o eventi avversi gravi correlati al trapianto. L'ultimo trial clinico che Viacyte sta conducendo in collaborazione con CRISPR Therapeutics (PEC-QT, VCTX210), prevede l'utilizzo di cellule geneticamente modificate per essere meno immunogene, incapsulate nel dispositivo senza la necessità di una terapia immunosoppressiva.

Un'altra realtà è approdata in clinica nel 2021 con una strategia diversa da quella di Viacyte. La company Vertex sta infatti conducendo uno studio clinico in fase 1/2, con un prodotto denominato VX-880 (NCT04786262). VX-880 consiste in β -cellule derivanti da ESC completamente differenziate in vitro e trapiantate nel fegato tramite infusione in vena porta accoppiata a una terapia immunosoppressiva. Questo approccio è volto a valutare le β -cellule mature derivate da ESC come fonte alternativa rispetto alle isole da donatore, ma mantiene tutte le altre caratteristiche (sito di impianto, tipologia riceventi, immunosoppressione) del trapianto di isole. Gli stessi scienziati stanno comunque lavorando a un dispositivo di macroincapsulamento che consentirà a breve di sperimentare queste β -cellule in assenza di immunosoppressione. I risultati di questi studi saranno tappe fondamentali nel percorso verso la cura del diabete di tipo 1 con la terapia cellulare e indirizzeranno le scelte future in termini di differenziamento da cellule staminali pluripotenti, protezione dal rischio di tumori e dal rigetto.

CONCLUSIONE

Una nuova fonte infinita di β -cellule derivante da cellule staminali pluripotenti rappresenta un traguardo importante per la terapia cellulare del T1D. Studi clinici sono già in corso utilizzando β -cellule derivanti da ESC e stanno mettendo alla prova la vera potenzialità delle cellule staminali. Tra le cellule staminali, le iPSC stanno suscitando un grade interesse poiché potrebbero essere utilizzate come fonte di cellule autologhe per il trattamento del

diabete. Tuttavia, è necessario un sistema di coltura più efficiente per generare β -cellule funzionali per applicazioni cliniche. Inoltre, poiché l'utilizzo in clinica di β -cellule derivate da iPSC si sta avvicinando, la risoluzione delle criticità legate alla sicurezza e al rigetto immunitario stanno diventando di essenziale importanza. Un'iPSC migliore può essere ottenuta utilizzando la riprogrammazione chimica o vettori non integranti. Inoltre, un miglior prodotto cellulare finale può essere ottenuto tramite purificazione di β -cellule utilizzando marcatori di superficie specifici, tramite l'eliminazione della frazione residua di PSC o il controllo della formazione di teratomi in vivo tramite l'editing genetico con l'inserimento di un gene suicida. Infine, si sta cercando di controllare il rigetto tramite tecniche di incapsulamento e di editing delle cellule per renderle meno immunogeniche.

BIBLIOGRAFIA

- Vettoretti M, Cappon G, Acciaroli G, Facchinetti A, Sparacino G. Continuous Glucose Monitoring: Current Use in Diabetes Management and Possible Future Applications. *J Diabetes Sci Technol* 12: 1064-71, 2018. doi: 10.1177/1932296818774078.
- Schwartz SS, Epstein S, Corkey BE, Grant SFA, Gavin JR, Aguilar RB, et al. A Unified Pathophysiological Construct of Diabetes and its Complications. *Trends Endocrinol Metab* 28: 645-55, 2017. doi: 10.1016/j.tem.2017.05.005.
- Meloche RM. Transplantation for the treatment of type 1 diabetes. *World J Gastroenterol* 13:6347-55, 2007. doi: 10.3748/WJG.V13.I47.6347.
- Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 37: 413-20, 1988. doi: 10.2337/DIAB.37.4.413.
- Hering BJ, Clarke WR, Bridges ND, Eggerman TL, Alejandro R, Bellin MD, et al. Phase 3 Trial of Transplantation of Human Islets in Type 1 Diabetes Complicated by Severe Hypoglycemia. *Diabetes Care* 39: 1230-40, 2016. doi: 10.2337/DC15-1988.
- Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 54: 2060-9, 2005. doi: 10.2337/DIABETES.54.7.2060.
- Bourgeois S, Sawatani T, Van Mulders A, De Leu N, Heremans Y, Heimberg H, et al. Towards a Functional Cure for Diabetes Using Stem Cell-Derived Beta Cells: Are We There Yet? *Cells* 10: 1-24, 2021. doi: 10.3390/CELLS10010191.

10. Shapiro AMJ, Thompson D, Donner TW, Bellin MD, Hsueh W, Pettus J, et al. Insulin expression and C-peptide in type 1 diabetes subjects implanted with stem cell-derived pancreatic endoderm cells in an encapsulation device. *Cell Reports Med* 2, 2021. doi: 10.1016/J.XCRM.2021.100466/ATTACHMENT/A67DE154-950D-4CD3-B868-340DoCAE7BoB/MMC2.XLSX.
11. Ramzy A, Thompson DM, Ward-Hartstonge KA, Iverson S, Cook L, Garcia R V., et al. Implanted pluripotent stem-cell-derived pancreatic endoderm cells secrete glucose-responsive C-peptide in patients with type 1 diabetes. *Cell Stem Cell* 28: 2047-61.e5, 2021. doi: 10.1016/J.STEM.2021.10.003.
12. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-76, 2006. doi: 10.1016/J.CELL.2006.07.024.
13. Puri MC, Nagy A. Concise review: Embryonic stem cells versus induced pluripotent stem cells: the game is on. *Stem Cells* 30: 10-4, 2012. doi: 10.1002/STEM.788.
14. D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazar S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 23: 1534-41, 2005. doi: 10.1038/NBT1163.
15. D'Amour KA, Bang AG, Eliazar S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 24: 1392-401, 2006. doi: 10.1038/NBT1259.
16. Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 26: 443-52, 2008. doi: 10.1038/NBT1393.
17. Pagliuca FW, Millman JR, Gürtler M, Segel M, Van Der vort A, Ryu JH, et al. Generation of functional human pancreatic β cells in vitro. *Cell* 159: 428-39, 2014. doi: 10.1016/J.CELL.2014.09.040.
18. Pellegrini S, Manenti F, Chimienti R, Nano R, Ottoboni L, Ruffini F, et al. Differentiation of Sendai Virus-Reprogrammed iPSC into β Cells, Compared with Human Pancreatic Islets and Immortalized β Cell Line. *Cell Transplant* 27: 1548-60, 2018. doi: 10.1177/0963689718798564.
19. Maxwell KG, Millman JR. Applications of iPSC-derived beta cells from patients with diabetes. *Cell Reports Med* 2:100238, 2021. doi: 10.1016/J.XCRM.2021.100238.
20. Velazco-Cruz L, Song J, Maxwell KG, Goedegebuure MM, Augsornworawat P, Hogrebe NJ, et al. Acquisition of Dynamic Function in Human Stem Cell-Derived β Cells. *Stem Cell Reports* 12: 351-65, 2019. doi: 10.1016/J.STEMCR.2018.12.012.
21. Augsornworawat P, Maxwell KG, Velazco-Cruz L, Millman JR. Single-Cell Transcriptome Profiling Reveals β Cell Maturation in Stem Cell-Derived Islets after Transplantation. *Cell Rep* 32, 2020. doi: 10.1016/J.CELREP.2020.108067.
22. Rezanian A, Bruin JE, Riedel MJ, Mojibian M, Asadi A, Xu J, et al. Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice. *Diabetes* 61: 2016-29, 2012. doi: 10.2337/DB11-1711.
23. Bruin JE, Rezanian A, Xu J, Narayan K, Fox JK, O'Neil JJ, et al. Maturation and function of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors in macroencapsulation devices following transplant into mice. *Diabetologia* 56: 1987-98, 2013. doi: 10.1007/S00125-013-2955-4.
24. Singh R, Cottle L, Loudovaris T, Xiao D, Yang P, Thomas HE, et al. Enhanced structure and function of human pluripotent stem cell-derived beta-cells cultured on extracellular matrix. *Stem Cells Transl Med* 10: 492-505, 2021. doi: 10.1002/SCTM.20-0224.
25. Augsornworawat P, Velazco-Cruz L, Song J, Millman JR. A hydrogel platform for in vitro three dimensional assembly of human stem cell-derived islet cells and endothelial cells. *Acta Biomater* 97: 272-80, 2019. doi: 10.1016/J.ACTBIO.2019.08.031.
26. Chmielowiec J, Szlachcic WJ, Yang D, Scavuzzo MA, Wamble K, Sarrion-Perdigones A, et al. Human pancreatic microenvironment promotes β -cell differentiation via non-canonical WNT5A/JNK and BMP signaling. *Nat Commun* 13: 1-18, 2022. doi: 10.1038/s41467-022-29646-1.
27. Helman A, Cangelosi AL, Davis JC, Pham Q, Rothman A, Faust AL, et al. A Nutrient-Sensing Transition at Birth Triggers Glucose-Responsive Insulin Secretion. *Cell Metab* 31: 1004-16, 2020. doi: 10.1016/J.CMET.2020.04.004.
28. Ghazizadeh Z, Kao DI, Amin S, Cook B, Rao S, Zhou T, et al. ROCKII inhibition promotes the maturation of human pancreatic beta-like cells. *Nat Commun* 8, 2017. doi: 10.1038/S41467-017-00129-Y.
29. Ribeiro D, Kvist AJ, Wittung-Stafshede P, Hicks R, Forslöw A. 3D-Models of Insulin-Producing β -Cells: from Primary Islet Cells to Stem Cell-Derived Islets.

- Stem Cell Rev Reports 14: 177-88, 2018. doi: 10.1007/S12015-017-9783-8.
30. Du Y, Liang Z, Wang S, Sun D, Wang X, Liew SY, et al. Human pluripotent stem-cell-derived islets ameliorate diabetes in non-human primates. *Nat Med* 28: 272-82, 2022. doi: 10.1038/S41591-021-01645-7.
 31. Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer* 11: 268-77, 2011. doi: 10.1038/NRC3034.
 32. Lee AS, Tang C, Rao MS, Weissman IL, Wu JC. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nat Med* 19: 998-1004, 2013. doi: 10.1038/NM.3267.
 33. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 86-72, 2007. doi: 10.1016/J.CELL.2007.11.019.
 34. Belviso I, Romano V, Nurzynska D, Castaldo C, Meglio F Di. Non-integrating Methods to Produce Induced Pluripotent Stem Cells for Regenerative Medicine: An Overview. *Biomech Funct Tissue Eng* 2020. doi: 10.5772/INTECHOPEN.95070.
 35. Singh VK, Kalsan M, Kumar N, Saini A, Chandra R. Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front Cell Dev Biol* 3, 2015. doi: 10.3389/FCELL.2015.00002.
 36. Rao MS, Malik N. Assessing iPSC reprogramming methods for their suitability in translational medicine. *J Cell Biochem* 113: 3061-8, 2012. doi: 10.1002/JCB.24183.
 37. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hiramami Y, Morinaga C, Daimon T, et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med* 376: 1038-46, 2017. doi: 10.1056/NEJMOA1608368.
 38. Guan J, Wang G, Wang J, Zhang Z, Fu Y, Cheng L, et al. Chemical reprogramming of human somatic cells to pluripotent stem cells. *Nature* 605, 2022. doi: 10.1038/S41586-022-04593-5.
 39. Jiang W, Sui X, Zhang D, Liu M, Ding M, Shi Y, et al. CD24: a novel surface marker for PDX1-positive pancreatic progenitors derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 29: 609-17, 2011. doi: 10.1002/STEM.608.
 40. Kelly OG, Chan MY, Martinson LA, Kadoya K, Ostertag TM, Ross KG, et al. Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 29: 750-6, 2011. doi: 10.1038/NBT.1931.
 41. Ameri J, Borup R, Prawiro C, Ramond C, Schachter KA, Scharfmann R, et al. Efficient Generation of Glucose-Responsive Beta Cells from Isolated GP2 + Human Pancreatic Progenitors. *Cell Rep* 19: 36-49, 2017. doi: 10.1016/J.CELREP.2017.03.032.
 42. Cogger KF, Sinha A, Sarangi F, McCaugh EC, Saunders D, Dorrell C, et al. Glycoprotein 2 is a specific cell surface marker of human pancreatic progenitors. *Nat Commun* 8, 2017. doi: 10.1038/S41467-017-00561-0.
 43. Veres A, Faust AL, Bushnell HL, Engquist EN, Kenty JHR, Harb G, et al. Charting cellular identity during human in vitro β -cell differentiation. *Nature* 569: 368-73, 2019. doi: 10.1038/S41586-019-1168-5.
 44. Parent A V., Ashe S, Nair GG, Li M-L, Chavez J, Liu JS, et al. Development of a scalable method to isolate subsets of stem cell-derived pancreatic islet cells. *Stem Cell Reports* 17: 979-92, 2022. doi: 10.1016/J.STEMCR.2022.02.001.
 45. Fong CY, Peh GSL, Gauthaman K, Bongso A. Separation of SSEA-4 and TRA-1-60 labelled undifferentiated human embryonic stem cells from a heterogeneous cell population using magnetic-activated cell sorting (MACS) and fluorescence-activated cell sorting (FACS). *Stem Cell Rev Reports* 5: 72-80, 2009. doi: 10.1007/S12015-009-9054-4.
 46. Tang C, Lee AS, Volkmer JP, Sahoo D, Nag D, Mosley AR, et al. An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells. *Nat Biotechnol* 29: 829-34, 2011. doi: 10.1038/NBT.1947.
 47. Choo AB, Tan HL, Ang SN, Fong WJ, Chin A, Lo J, et al. Selection against undifferentiated human embryonic stem cells by a cytotoxic antibody recognizing podocalyxin-like protein-1. *Stem Cells* 26: 1454-63, 2008. doi: 10.1634/STEMCELLS.2007-0576.
 48. Lim DYX, Ng YH, Lee J, Mueller M, Choo AB, Wong VVT. Cytotoxic antibody fragments for eliminating undifferentiated human embryonic stem cells. *J Biotechnol* 153: 77-85, 2011. doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2011.03.017.
 49. Tateno H, Onuma Y, Ito Y, Minoshima F, Saito S, Shimizu M, et al. Elimination of tumorigenic human pluripotent stem cells by a recombinant lectin-toxin fusion protein. *Stem Cell Reports* 4: 811-20, 2015. doi: 10.1016/J.STEMCR.2015.02.016.
 50. Ben-David U, Nudel N, Benvenisty N. Immunologic and chemical targeting of the tight-junction protein Clau-

- din-6 eliminates tumorigenic human pluripotent stem cells. *Nat Commun* 4, 2013. doi: 10.1038/NCOMMS2992.
51. Park J, Lee NG, Oh M, Song J, Kim W, Kwon MG, et al. Selective elimination of human pluripotent stem cells by Anti-Dsg2 antibody-doxorubicin conjugates. *Biomaterials* 259, 2020. doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2020.120265.
 52. Sougawa N, Miyagawa S, Fukushima S, Kawamura A, Yokoyama J, Ito E, et al. Immunologic targeting of CD30 eliminates tumorigenic human pluripotent stem cells, allowing safer clinical application of hiPSC-based cell therapy. *Sci Rep* 8, 2018. doi: 10.1038/S41598-018-21923-8.
 53. Zamarian V, Pellegrini S, Landi E, Manenti F, Schiavoleona M, Citro A, et al. 209.3: Treating iPSC-derived β Cells With Monoclonal Antibody Brentuximab Reduces the Risk of Teratoma Upon Transplantation. *Transplantation* 105: S14, 2021. doi: 10.1097/01.TP.0000804348.54160.6B.
 54. Kimura Y, Shofuda T, Higuchi Y, Nagamori I, Oda M, Nakamori M, et al. Human Genomic Safe Harbors and the Suicide Gene-Based Safeguard System for iPSC-Based Cell Therapy. *Stem Cells Transl Med* 8: 627-38, 2019. doi: 10.1002/SCTM.18-0039.
 55. Qadir MME, Álvarez-Cubela S, Belle K, Sapir T, Messaggio F, Johnson KB, et al. A Double Fail-Safe Approach to Prevent Tumorigenesis and Select Pancreatic β Cells from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports* 12: 611-23, 2019. doi: 10.1016/J.STEMCR.2019.01.012.
 56. Kiuru M, Boyer JL, O'Connor TP, Crystal RG. Genetic control of wayward pluripotent stem cells and their progeny after transplantation. *Cell Stem Cell* 4: 289-300, 2009. doi: 10.1016/J.STEM.2009.03.010.
 57. Chen F, Cai B, Gao Y, Yuan X, Cheng F, Wang T, et al. Suicide gene-mediated ablation of tumor-initiating mouse pluripotent stem cells. *Biomaterials* 34: 1701-11, 2013. doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2012.11.018.
 58. Hara A, Aoki H, Taguchi A, Niwa M, Yamada Y, Kunisada T, et al. Neuron-like differentiation and selective ablation of undifferentiated embryonic stem cells containing suicide gene with Oct-4 promoter. *Stem Cells Dev* 17: 619-27, 2008. doi: 10.1089/SCD.2007.0235.
 59. Stewart R, Yang C, Anyfantis G, Przyborski S, Hole N, Strachan T, et al. Silencing of the expression of pluripotent driven-reporter genes stably transfected into human pluripotent cells. *Regen Med* 3: 505-22, 2008. doi: 10.2217/17460751.3.4.505.
 60. Naujok O, Kaldrack J, Taivankhuu T, Jörns A, Lenzen S. Selective removal of undifferentiated embryonic stem cells from differentiation cultures through HSV1 thymidine kinase and ganciclovir treatment. *Stem Cell Rev Reports* 6: 450-61, 2010. doi: 10.1007/S12015-010-9148-Z.
 61. Sadelain M, Papapetrou EP, Bushman FD. Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. *Nat Rev Cancer* 12: 51-8, 2011. doi: 10.1038/NRC3179.
 62. Yoshihara M, Murakawa Y. An update on clinical applications of iPSCs from a genomic point of view. *Curr Top IPSCs Technol*: 147-75, 2022. doi: 10.1016/B978-0-323-99892-5.00001-3.
 63. Liu X, Li W, Fu X, Xu Y. The Immunogenicity and Immune Tolerance of Pluripotent Stem Cell Derivatives. *Front Immunol* 8, 2017. doi: 10.3389/FIMMU.2017.00645.
 64. Ryan EE, Paty BW, Senior PA, Shapiro AMJ. Risks and side effects of islet transplantation. *Curr Diab Rep* 4: 304-9, 2004. doi: 10.1007/S11892-004-0083-8.
 65. Desai T, Shea LD. Advances in islet encapsulation technologies. *Nat Rev Drug Discov* 16: 338-50, 2017. doi: 10.1038/NRD.2016.232.
 66. Song S, Roy S. Progress and challenges in macroencapsulation approaches for type 1 diabetes (T1D) treatment: Cells, biomaterials, and devices. *Biotechnol Bioeng* 113: 1381-402, 2016. doi: 10.1002/BIT.25895.
 67. Kumagai-Braesch M, Jacobson S, Mori H, Jia X, Takahashi T, Wernerson A, et al. The TheraCyte™ device protects against islet allograft rejection in immunized hosts. *Cell Transplant* 22: 1137-46, 2013. doi: 10.3727/096368912X657486.
 68. Motté E, Szepessy E, Suenens K, Stangé G, Bomans M, Jacobs-Tulleneers-Thevissen D, et al. Composition and function of macroencapsulated human embryonic stem cell-derived implants: comparison with clinical human islet cell grafts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 307: E838-46, 2014. doi: 10.1152/AJPENDO.00219.2014.
 69. Boettler T, Schneider D, Cheng Y, Kadoya K, Brandon EP, Martinson L, et al. Pancreatic Tissue Transplanted in TheraCyte Encapsulation Devices Is Protected and Prevents Hyperglycemia in a Mouse Model of Immune-Mediated Diabetes. *Cell Transplant* 25: 609-14, 2016. doi: 10.3727/096368915X688939.
 70. Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210: 908-10, 1980. doi: 10.1126/SCIENCE.6776628.
 71. De Groot M, Schuurs TA, Van Schilfgaarde R. Causes of limited survival of microencapsulated pancreatic

- islet grafts. *J Surg Res* 121: 141-50, 2004. doi: 10.1016/J.JSS.2004.02.018.
72. Ludwig B, Reichel A, Steffen A, Zimmerman B, Schally AV, Block NL, et al. Transplantation of human islets without immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 19054-58, 2013. doi: 10.1073/PNAS.1317561110.
73. Veiseh O, Doloff JC, Ma M, Vegas AJ, Tam HH, Bader AR, et al. Size- and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and non-human primates. *Nat Mater* 14: 643-51, 2015. doi: 10.1038/NMAT4290.
74. Vegas AJ, Veiseh O, Gürtler M, Millman JR, Pagliuca FW, Bader AR, et al. Long-term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell-derived beta cells in immune-competent mice. *Nat Med* 22: 306-11, 2016. doi: 10.1038/NM.4030.
75. Mandal PK, Ferreira LMR, Collins R, Meissner TB, Boutwell CL, Friesen M, et al. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell* 15: 643-52, 2014. doi: 10.1016/J.STEM.2014.10.004.
76. Mattapally S, Pawlik KM, Fast VG, Zumaquero E, Lund FE, Randall TD, et al. Human Leukocyte Antigen Class I and II Knockout Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cells: Universal Donor for Cell Therapy. *J Am Heart Assoc* 7, 2018. doi: 10.1161/JAHA.118.010239.
77. Yoshihara E, O'Connor C, Gasser E, Wei Z, Oh TG, Tseng TW, et al. Immune-evasive human islet-like organoids ameliorate diabetes. *Nature* 586: 606-11, 2020. doi: 10.1038/S41586-020-2631-Z.
78. Gornalusse GG, Hirata RK, Funk SE, Riobobos L, Lopes VS, Manske G, et al. HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells. *Nat Biotechnol* 35: 765-72, 2017. doi: 10.1038/NBT.3860.
79. Shi L, Li W, Liu Y, Chen Z, Hui Y, Hao P, et al. Generation of hypoimmunogenic human pluripotent stem cells via expression of membrane-bound and secreted β 2m-HLA-G fusion proteins. *Stem Cells* 38: 1423-37, 2020. doi: 10.1002/STEM.3269.
80. Han X, Wang M, Duan S, Franco PJ, Kenty JHR, Hedrick P, et al. Generation of hypoimmunogenic human pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 116: 10441-6, 2019. doi: 10.1073/PNAS.1902566116.
81. Castro-Gutierrez R, Alkanani A, Mathews CE, Michels A, Russ HA. Protecting Stem Cell Derived Pancreatic Beta-Like Cells From Diabetogenic T Cell Recognition. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12, 2021. doi: 10.3389/FENDO.2021.707881.