

a cura di Carla Greco<sup>1</sup>, Massimiliano Cavallo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unità di Endocrinologia, Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università di Modena e Reggio Emilia;

<sup>2</sup>Medicina interna, Azienda Ospedaliera "Santa Maria" di Terni

Terapia cellulare e molecolare  
sperimentale del diabete mellito  
di tipo 1 con cellule staminali:  
stato attuale  
*Cell and molecular therapy for the  
treatment of type 1 diabetes mellitus  
by stem cells: current status*

Alessia Greco, Pia Montanucci, Teresa Pescara,  
Giuseppe Basta e Riccardo Calafiore

Struttura Complessa di Medicina Interna e Scienze Endocrine e Metaboliche (MISEM), Laboratorio Trapianti Cellulari Endocrini ed Organi Ibridi, Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Perugia

DOI: <https://doi.org/10.30682/ildia2203f>

**ABSTRACT**

*Advances in cell and molecular technology have fostered development of innovative approaches to manage type 1 diabetes mellitus. The main focus is to replace destroyed  $\beta$  cells by induced pluripotent-(hiPSC) and/or mesenchymal stem cells (hMSC) thanks to multi-step differentiation protocols. The aim is to obtain  $\beta$ -like cells invisible to the host's immune system by their physical envelopment within recombinant, last generation biopolymers that prevent contact between embodied cells and host's immune system, thereby avoiding recipient's general immunosuppression with its global side effects.*

**KEYWORDS**

*Hyperglycemia, cure, cell differentiation, insulin, biopolymers.*

**INTRODUZIONE**

Il diabete mellito è ormai definito una “global epidemics” per la sua crescente prevalenza nella popolazione mondiale. Soprattutto temibili agli effetti della salute dei soggetti colpiti, sono le complicanze acute e croniche di questo disordine metabolico, a volte anche letali se non sottoposte a trattamenti adeguati ed ancora prima a idonee misure preventive. Il diabete di tipo 1 (DMT1) colpisce pazienti di tutte le età, ma principalmente adolescenti e giovani. Si tratta una malattia autoimmune in quanto il sistema immunitario attacca e distrugge le cellule  $\beta$  del pancreas insulino-secerenti, avendo come conseguenza l'immediata necessità di istituire un regime terapeutico con insulina esogena “life-time”. La distruzione delle cellule  $\beta$  dipende da una progressiva infiltrazione di linfociti CD4 auto reattivi dell'insula pancreatica (condizione patologica infiammatoria nota come insulite) con progressiva e selettiva distruzione delle  $\beta$ -cellule; l'insulite specifica può precedere anche di molti anni i difetti insulino-secretori che porteranno poi all'emergenza clinica del DMT1. Nonostante i miglioramenti che la ricerca ha conseguito in termini di farmacoterapia, di monitoraggio e di gestione clinica a lungo termine del paziente diabetico, il rischio di mortalità prematura nel paziente con DMT1 supera di 2-10 volte quello della popolazione generale. La cura radicale del DMT1 è l'obiettivo che la comunità scientifica si è posta già da qualche decennio, con lo sviluppo di terapie cellulari e/o molecolari sperimentali, nel tentativo di validare una possibile alternativa alla terapia insulinica. In tal senso, il campo della medicina rigenerativa offre rilevanti opportunità per generare cellule  $\beta$  o  $\beta$ -like da diversi stadi di cellule staminali, a scopo sostitutivo. Tra

le possibili strategie terapeutiche vi sono: 1) induzione della rigenerazione endogena delle cellule  $\beta$ ; 2) trapianto di insule pancreatiche di donatori e/o di cellule  $\beta$ -like, derivate principalmente da cellule staminali umane indotte alla pluripotenza (hiPSC) (1). Le cellule staminali sono dunque opportunamente differenziate in vitro, verso il fenotipo insulino-secrente, in modelli cellulari 2D o 3D. Oltre alla necessità di ottenere una adeguata risposta insulinica, tale approccio innovativo, per diventare una terapia condivisa, deve ancora superare importanti ostacoli come la ricorrenza della malattia autoimmune (tipica del DMT1) e i rischi associati al rigetto di trapianto di cellule *non-self*. Per ovviare a quest'ultima problematica, negli anni sono stati condotti e validati studi volti a immuno-isolare gli aggregati cellulari all'interno di microcapsule di alginato di sodio "clinical grade" e poli-amminoacidi, prima del trapianto (2-3).

Anche se le cellule insulino-secrenti possono essere generate da una varietà di tipi di cellule staminali come le cellule staminali pluripotenti e le cellule staminali embrionali, le cellule ideali potrebbero derivare dalle cellule degli stessi pazienti (autologhe), espanse in vitro a livelli appropriati, mediante specifiche e controllate tecniche di coltura. Fisiologicamente, le cellule  $\beta$  sono particolarmente sensibili a diversi tipi di stress, che ne compromettono fortemente la loro morfologia e, di conseguenza, la loro funzione. Ciononostante, la capacità di tali cellule di "trasformarsi" in cellule de-differenziate per poi essere re-differenziate verso fenotipi cellulari insulino-secrenti potrebbe rappresentare la soluzione ideale.

#### DIFFERENZIAMENTO $\beta$ -CELLULARE E CELLULE STAMINALI INDOTTE ALLA PLURIPOTENZA (HIPSC)

Le hiPSC generate per la prima volta nel 2006 a partire da cellule somatiche adulte mediante riprogrammazione genetica, sembrano possedere le stesse caratteristiche e capacità differenziative delle cellule staminali embrionali (ESC), ovviando così ai problemi anche etici correlati all'impiego di queste ultime (4); inoltre, le hiPSC possiedono l'ulteriore vantaggio di poter essere derivate anche da pazienti con diabete, limitando la potenziale risposta autoimmune (5). Al fine di indurre la differenziazione delle hiPSC in cellule del *lineage* pancreatico endocrino è stata sviluppata in vitro una strategia per riprodurre i normali stadi di sviluppo del pancreas umano, attraverso un processo *multi-step* che utilizza l'espressione di fattori di trascrizione chiave coinvolti nell'organogenesi, nella fattispecie pancreaticata. Negli ultimi anni vari gruppi di ricerca hanno descritto e proposto diversi protocolli con l'obiettivo di ottenere cellule capaci di produrre e secernere insulina in risposta al glucosio, con il fine di normalizzare la glicemia, in modelli diabetici murini (6).

Nel caso specifico della differenziazione di cellule staminali pluripotenti, le varie fasi di sviluppo vengono indotte utilizzando una complessa e diversificata combinazione di fattori di crescita o composti chimici e/o piccole molecole. Essendo il pancreas un organo di derivazione endodermica, tra i fattori più importanti vi è l'Attivina nodale (responsabile dello sviluppo dell'endoderma definitivo) seguita poi da Wnt, l'acido retinoico, hedgehog, il fattore di crescita dei fibroblasti, il fattore di crescita epidermico, la proteina morfogenetica ossea e Notch, per attivare o inibire le vie di *signaling* coinvolte (7-8). Tuttavia, la generazione di queste cellule resta complessa, sia in termini di tempistica e costo, sia talvolta di inefficienza nell'ottenimento del fenotipo desiderato, spesso correlato ad una instabilità intrinseca delle colture di hiPSC (9). Negli ultimi 5 anni, i protocolli di differenziazione sono stati ulteriormente modificati e perfezionati, ottenendo comunque cellule con un fenotipo assimilabile al massimo alle cellule  $\beta$  native (10). Generalmente, le cellule differenziate in vitro assumono una morfologia tridimensionale (sotto forma di sferoidi, nel caso di protocolli che prevedono una coltura in sospensione e non in adesione) ed esprimono livelli di ormoni solo in parte assimilabili alle cellule  $\beta$  e altri geni specifici; tuttavia, è emerso che il microambiente attorno a ogni singola cellula, all'interno di uno sferoide, non è controllato ad hoc e dunque può non essere ottimale, per la differenziazione e successivamente per la funzione cellulare. Questo potrebbe essere importante poiché il normale ambiente insulare intorno alle singole cellule  $\beta$  native ha un effetto drammatico sia sulla loro struttura che sulla funzione (11).

Dalla quasi totalità dei protocolli descritti in letteratura, emerge che le cellule  $\beta$  derivate da hiPSC contengono e secernono poca insulina rispetto alle cellule  $\beta$  native, non rispondono altrettanto bene alle normali concentrazioni di glucosio nel sangue e hanno una durata limitata. Pertanto, da questi protocolli sperimentali si ottengono tipicamente

sferoidi di poche centinaia di cellule composte da cellule  $\beta$ -like immature assieme ad altri tipi cellulari poli-ormonali, come cellule  $\alpha$  e  $\delta$ , secernenti rispettivamente glucagone e somatostatina.

### CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DERIVATE DALLA MATRICE DI WHARTON DEL CORDONE OMBELICALE (HUCMS) NEL DIFFERENZIAMENTO $\beta$ -CELLULARE

Rispetto alle hESC e alle hiPSC, le cellule staminali mesenchimali (MSC) non sono state molto spesso considerate per la generazione di cellule insulino-secernenti, nonostante siano cellule privilegiate e altamente plastiche che possono essere isolate e coltivate da vari tessuti come, tra gli altri, il cordone ombelicale (Gelatina di Wharton) (12). Le MSC costituiscono una popolazione di cellule staminali adulte multipotenti e sono state descritte come cellule aderenti alla plastica, con morfologia fibroblastoide (13-14), con la peculiare capacità di differenziare spontaneamente, sia in vitro sia in vivo, in tutti i tessuti specializzati di derivazione embrionale mesodermica (tessuto osseo, tessuto cartilagineo e tessuto adiposo), ma anche ectodermica ed endodermica. Le MSC isolate dalla matrice di Wharton del cordone ombelicale, note come hUCMS mostrano inoltre l'espressione variabile di marcatori associati alla pluripotenza come OCT 3/4, SSEA1 e NANOG, che indubbiamente contribuiscono al loro ampio potenziale di differenziazione e capacità proliferativa (15).

Le hUCMS, tuttavia, possiedono anche alcuni marcatori genetici e di superficie che sono comuni anche alle altre MSC, fra questi il CD10, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 ed il CD105, e il marcatore aggiuntivo CD117 (16), senza esprimere d'altra parte i marcatori delle cellule staminali ematopoietiche come il CD31, CD34, il CD45 e l'antigene leucocitario umano (HLA)-DR. In vitro, le hUCMS hanno dimostrato di possedere proprietà immuno-modulatorie, in quanto sono in grado di sopprimere la proliferazione dei linfociti e la formazione di cellule T citotossiche e *natural killer* in colture linfocitarie miste (17). Possono inoltre indurre la differenziazione delle cellule dendritiche tollerogeniche e promuovere l'espansione delle Treg CD25<sup>+</sup> (18). I meccanismi che regolano il potenziale immunosoppressivo e immuno-regolatorio delle hUCMS non sono stati pienamente chiariti, tuttavia sono state avanzate due ipotesi: 1) secrezione di fattori solubili quali indoleammina 2,3-diossigenasi (IDO), l'interleuchina (IL)-6, *Transforming Growth Factor* (TGF)- $\beta$ 1, l'*Hepatocyte Growth Factor* (HGF), *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE-2) (19); 2) interazione diretta cellula-cellula con le cellule del sistema immunitario. La capacità immunosoppressiva delle hUCMS non è innata, ma principalmente indotta da citochine pro-infiammatorie, in particolare da Interferon (IFN)- $\gamma$ ; è stato anche ipotizzato che la produzione di citochine pro-infiammatorie durante la risposta immunitaria sia in grado di indurre l'espressione delle chemochine da parte delle hUCMS.

Oltre alle molecole immuno-regolatorie, le hUCMS esprimono costitutivamente gli antigeni non classici HLA-G e le molecole co-inibitorie B7-H1 e B7-H4, che modulano la risposta immunitaria (20). In condizioni fisiologiche, l'espressione costitutiva di HLA-G è presente in organi immuno-privilegiati (come testicolo, ovaio e cellule fetali) ed è associato a proprietà tollerogeniche mediante l'interazione con i recettori inibitori presenti sulle cellule dendritiche (DC), *natural killer* (NK) e le cellule T.

Dati l'ormai indubbio potere immunomodulatorio e la propensione a differenziare verso il fenotipo endodermico delle hUCMS, la comunità scientifica si sta interrogando sulla possibilità di studiare protocolli ad hoc per utilizzare tali cellule nella terapia cellulare del diabete mellito di tipo 1. Difatti, è stata dimostrata la possibilità di indurre il differenziamento verso il fenotipo insulino-secernente, seppur in modo ancora incompleto.

In vitro, la differenziazione delle cellule  $\beta$  da cellule staminali mesenchimali segue in linea generale due passaggi principali: il primo prevede che le cellule vengano differenziate in progenitori pancreatici (utilizzando la nicotinamide con o senza fattori di crescita o peptidi, in colture ad alto contenuto di glucosio), mentre il secondo induce la maturazione delle cellule  $\beta$ -like, grazie all'azione combinata di nicotinamide, sodio butirato, exendina-4 o peptide-1 simile al glucagone GLP-1 (21).

È evidente che il processo differenziativo delle MSC, a differenza di quello di hESC o hiPSC, inizia dallo stadio pancreatico, avendo già completato lo sviluppo dell'endoderma definitivo (22). Può accadere che le cellule differenziate

mostrino fenotipi anomali rispetto alla convenzionale cellula  $\beta$  e i cluster cellulari siano costituiti da una popolazione eterogenea di cellule endocrine (23): quindi ciò che si ottiene è una popolazione variabile di cellule non specificamente funzionali con fenotipi cellulari poli-ormonali.

Pertanto, i protocolli attuali generano cellule che presentano soltanto alcune delle caratteristiche biologiche delle cellule  $\beta$ , e si rende così necessaria un'ulteriore ottimizzazione del processo di riprogrammazione in vitro, per poter arrivare a generare cellule quanto più simili alle cellule  $\beta$  mature e funzionali per gettare le basi per un futuro impiego in terapia.

Inoltre, oggi si fa sempre più interessante lo sviluppo di una coltura tridimensionale (3D) multicellulare, sia per garantire una maggiore funzionalità del tessuto che si intende ricreare, che per ottenere un'efficiente differenziazione e maturazione delle cellule  $\beta$  pancreatiche, in quanto la l'organoide così ottenuto simula l'ambiente fisiologico cellulare intrinseco (polarizzazione cellulare, allineamento e nicchie) (24).

## REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE

Un grande numero di fattori di trascrizione è implicato nel controllo del differenziamento endocrino-pancreatico e molti di questi sono già espressi nei primi stadi dello sviluppo dell'organo ed appartengono alle famiglie dei fattori tipo *homeodomain* (Pdx1, Hb9, Hnf6, Pax4, Pax6, Nkx2.2, Nkx6.1, Isl1), alla famiglia *basic helix-loop-helix* (bHLH) (Ngn3, NeuroD) e alla famiglia *forkhead/winged helix* (Foxa2/Hnf3 $\beta$ ).

È noto che homeobox 1 pancreatico e duodenale (PDX1), neurogenina-3 (NEUROG3) e/o MAF BZIP Transcription Factor A (MAFA), sono tra i geni fondamentali coinvolti nel processo differenziativo delle cellule  $\beta$ . PDX1, noto anche come fattore 1 del promotore dell'insulina, è un fattore di trascrizione che nei vertebrati è necessario per lo sviluppo del pancreas, inclusa la maturazione delle cellule  $\beta$  e la differenziazione duodenale. Infatti, PDX1 interagisce direttamente con NEUROD1 (Differenziazione neuronale 1), e forma un complesso di attivazione trascrizionale sul promotore dell'insulina. In sinergia con NKX2.2 (NK2 homeobox 2), un fattore di trascrizione a valle di NEUROG3, e FOXA2 (Forkhead box protein A2), un gene marcatore chiave per le cellule endodermiche definitive, PDX1 regola l'espressione di MAFA, specifica delle cellule  $\beta$ , attraverso il legame alla regione del potenziatore MAFA. A sua volta MAFA e le proteine MAFB (MAF BZIP Transcription Factor B) correlate regolano anche l'espressione PDX1. Studiando quindi la modulazione dell'espressione di tali marcatori si può seguire il pathway differenziativo in vitro delle cellule e generare, a partire da cellule non  $\beta$ , cellule insulino-secerenti. In vitro l'espressione di PDX1 viene "up-regolata" mediante il trattamento delle colture cellulari con fattori di crescita e/o piccole molecole, come l'acido retinoico, il fattore di crescita dei fibroblasti 7 (FGF-7) e 10 (FGF-10), gli inibitori del segnale Hedgehog (Sant-1) e gli attivatori della via del segnale della proteina chinasi. L'espressione di NEUROG3 viene invece "up-regolata" mediante il trattamento con gli inibitori del recettore TGF- $\beta$  di tipo I ed in particolare Alk5 inibitore II. L'espressione di MAFA si "up-regola" mediante trattamento con lo stesso Alk5 inibitore II e l'ormone tiroideo T<sub>3</sub> in associazione alla beta-cellulina, per favorire dunque l'indirizzamento verso un fenotipo maturo (25).

## FUNZIONE IN VITRO DELLE HIPSC DIFFERENZIATE

Dalla nostra esperienza e con le nostre condizioni di coltura otteniamo in partenza hiPSC che crescono in *cluster* separati, ben delineati e morfologicamente omogenei in cui l'analisi in immunofluorescenza per i marcatori specifici della pluripotenza conferma la presenza di Oct4, Sox2, Nanog, c-Myc e Ki67 su tutte le cellule di ciascun *cluster*; in aggiunta l'analisi citofluorimetrica conferma che in media oltre il 90% delle cellule è basalmente triplo positivo per Sox2, Oct4 e Nanog.

A seguito del protocollo di differenziamento da noi adottato e condotto su un modello di coltura 3D, in cui è stata indotta l'aggregazione meccanica delle hiPSC (26-27) si ottengono cellule di fenotipo endocrino, il più delle volte con fenotipo  $\beta$ -like, e talvolta con un fenotipo poli-ormonale, a conferma dell'efficienza del protocollo non ancora ottimizzata.

L'analisi del trascrittoma condotta mediante qPCR per i vari fattori coinvolti nel processo di differenziazione (ovvero, PDX-1, NKX6.1, SOX9, PTF1a, FOXA2, SOX17, CXCR4, c-KIT, Glut e Glucokinase), diversi da quelli espressi dalle cellule  $\beta$  (MafA, MafB, NKX2.2 e NKX6.1), ha evidenziato la modulazione della maggior parte di essi al termine del processo di maturazione. Tutti gli aggregati 3D che hanno completato il protocollo di differenziamento sono stati caratterizzati in primis per il contenuto dei tre principali ormoni pancreatici. La microscopia a fluorescenza ha confermato la presenza di insulina, ma anche di glucagone e somatostatina, sebbene a minore intensità. La produzione di insulina da parte degli sferoidi cellulari differenziati è stata dimostrata mediante TEM, dalla quale è stato possibile visualizzare granuli di insulina, all'interno degli sferoidi cellulari, alcuni dei quali associati a insulina, glucagone e somatostatina con le caratteristiche di ormoni di deposito, e altri invece di recente sintesi. Alcune aree degli aggregati cellulari, invece, non hanno mostrato granuli ormonali, probabilmente a causa di una alterata differenziazione di alcune delle cellule costituenti gli sferoidi, che potrebbero aver virato verso un fenotipo epatico. Ciò è plausibile data la vicinanza ontogenetica di pancreas e fegato.

A livello funzionale, l'incubazione statica con il glucosio ha confermato che la maggior parte dei lotti di hiPSC correttamente differenziati erano in grado di rispondere fisiologicamente a variazioni di concentrazione del glucosio. In questi lotti, la quantità di insulina secreta rispetto alle isole umane era bassa, ma con una cinetica secretoria del tutto fisiologica. La produzione finale di insulina, a 30 mM KCl, ha confermato la presenza di insulina residua, indicando dunque che le cellule ottenute erano in grado di immagazzinare insulina. Tuttavia, in alcuni lotti, quando la differenziazione era sub-ottimale, la quantità di insulina secreta, rispetto alle isole umane, era molto bassa e la cinetica era anormale, come già riportato in letteratura (28).

## IMMUNOPROTEZIONE: DALLE MICROCAPSULE AI BIOMATERIALI

Le hiPSC, differenziate e non, essendo dotate di complessi di istocompatibilità (HLA) per poter essere trapiantate devono essere sottoposte ad immuno-protezione per evitare e limitare la risposta del ricevente, e dunque un rigetto da parte dell'ospite. Per evitare la terapia immunosoppressiva generalizzata, si può ricorrere alle tecnologie di microincapsulamento. Oltre alle classiche microcapsule costituite da microsfele di acido alginico, a lungo studiate nel nostro laboratorio sia in studi preclinici, che clinici pilota in pazienti diabetici (2004-2009), sono potenzialmente disponibili materiali alternativi. È in effetti possibile ricorrere all'impiego di polimeri ricombinanti per ricoprire fisicamente, mediante una procedura di *coating* conformale, le hiPSC differenziate da destinare al trapianto, con lo scopo di renderle invisibili al sistema immunitario, senza alterarne però la loro struttura e la funzione.

La nostra attività di ricerca, condotta nell'ambito di un progetto europeo Horizon 2020, ci ha permesso di testare polimeri ricombinanti di elastina, chimicamente modificati (ELR) (29), per effettuare un *coating* prima del trapianto, in modelli murini. Si tratta di materiali peptidici ottenuti come proteine ricombinanti da un costrutto di DNA puramente sintetico (30-31). Gli studi condotti dapprima in vitro e poi in vivo su animali diabetici immuno-competenti confermano l'effettiva *performance* del polimero, in quanto non sono state riscontrate alterazioni né nella vitalità né nella funzione delle cellule  $\beta$ -like derivate dalle hiPSC, né tantomeno negli animali riceventi. Infatti, anche a diverse settimane dal trapianto non è emersa alcuna attivazione del sistema immunitario, se non quella fisiologicamente correlata alla procedura chirurgica nella sede di impianto, rappresentata nel nostro caso dalla cavità peritoneale. Il rivestimento con il polimero di hr-elastina risulta inoltre semipermeabile, il che significa che la membrana consente l'afflusso di ossigeno, sostanze nutritive e glucosio e rilascio di insulina attraverso la membrana capsulare, mentre impedisce il passaggio ai mediatori umorali che cellulari del sistema immunitario dell'ospite.

## CONCLUSIONI

A parte i recenti progressi, la terapia cellulare per la cura del diabete ha dovuto affrontare sfide per il successo nello sviluppo di cellule  $\beta$ -like funzionali e successivamente nel trapianto delle stesse. Ad oggi, lo sviluppo di cellule staminali produttrici di insulina non è ancora vicino al punto in cui il percorso clinico è fattibile, ed indubbiamente ulteriori studi aiuteranno a definire meglio questi aspetti.

È evidente però che il miglioramento delle strategie differenziative delle hiPSC associato all'individuazione ed al superamento delle criticità nella coltura e nell'immunogenicità delle stesse, gli studi sull'immuno-protezione e il tentativo di impiegare fonti cellulari alternative come le cellule staminali mesenchimali del cordone ombelicale, o la combinazione di vari elementi staminali, rappresentino grandi sfide per la terapia cellulare del diabete mellito di tipo 1, fornendo sempre più possibilità concrete di ottenere in futuro una sorgente possibilmente illimitata di cellule  $\beta$ -like funzionali e mature.

## BIBLIOGRAFIA

1. Van Hoof D, D'Amour KA, German MS. Derivation of insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Stem Cell Res* 3(2-3): 73-87, 2009.
2. Calafiore R, Basta G, Luca G, Calvitti M, Calabrese G, Racanicchi L, et al. Grafts of microencapsulated pancreatic islet cells for the therapy of diabetes mellitus in non-immunosuppressed animals. *Biotechnol Appl Biochem* 39(Pt 2): 159-64, 2004.
3. Calafiore R, Basta G, Luca G, Lemmi A, Montanucci MP, Calabrese G, et al. Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes: first two cases. *Diabetes Care* 29(1): 137-8, 2006.
4. 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(5): 861-72, 2007.
5. Maehr R, Chen S, Snitow M, Ludwig T, Yagasaki L, Goland R, et al. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(37): 15768-73, 2009.
6. Rezanian A, Bruin JE, Arora P, Rubin A, Batushansky I, Asadi A, et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 32(11): 1121-33, 2014.
7. 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(11): 1392-401, 2006.
8. Toyoda T, Mae S, Tanaka H, Kondo Y, Funato M, Hosokawa Y, et al. Cell aggregation optimizes the differentiation of human ESCs and iPSCs into pancreatic bud-like progenitor cells. *Stem Cell Res* 14(2): 185-97, 2015.
9. Hogrebe NJ, Maxwell KG, Augsornworawat P, Millman JR. Generation of insulin-producing pancreatic beta cells from multiple human stem cell lines. *Nat Protoc* 16(9): 4109-43, 2021.
10. Nair GG, Liu JS, Russ HA, Tran S, Saxton MS, Chen R, et al. Recapitulating endocrine cell clustering in culture promotes maturation of human stem-cell-derived beta cells. *Nat Cell Biol* 21(2): 263-74, 2019.
11. 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(3): 492-505, 2021.
12. Hass R, Kasper C, Bohm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* 9: 12, 2011.
13. Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica* 94(2): 258-63, 2009.
14. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7(5): 393-5, 2005.
15. Salama E, Eldeen GN, Abdel Rasheed M, Abdel Atti S, Elnoury A, Taha T, et al. Differentially expressed genes: OCT-4, SOX2, STAT3, CDH1 and CDH2, in cultured mesenchymal stem cells challenged with serum of women with endometriosis. *J Genet Eng Biotechnol* 16(1): 63-9, 2018.

16. La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, Magno F, Loria T, Lo Iacono M, et al. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem Cell Biol* 131(2): 267-82, 2009.
17. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 30(1): 42-8, 2002.
18. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)* 2: 8, 2005.
19. Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy KB, Weiss RJ, VanderWerff I, et al. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells* 26(11): 2865-74, 2008.
20. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 57(1): 11-20, 2003.
21. Pavathuparambil Abdul Manaph N, Sivanathan KN, Nitschke J, Zhou XF, Coates PT, Drogemuller CJ. An overview on small molecule-induced differentiation of mesenchymal stem cells into beta cells for diabetic therapy. *Stem Cell Res Ther* 10(1): 293, 2019.
22. Al Madhoun A, Ali H, AlKandari S, Atizado VL, Akhter N, Al-Mulla F, et al. Defined three-dimensional culture conditions mediate efficient induction of definitive endoderm lineage from human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 7(1): 165, 2016.
23. Santos TM, Percegon LS, Gonzalez P, Calil A, Corradi Perini C, Faucz FR, et al. Expression of pancreatic endocrine markers by mesenchymal stem cells from human umbilical cord vein. *Transplant Proc* 42(2): 563-65, 2010.
24. Dayem AA, Lee SB, Kim K, Lim KM, Jeon TI, Cho SG. Recent advances in organoid culture for insulin production and diabetes therapy: methods and challenges. *BMB Rep* 52(5): 295-303, 2019.
25. Zhu Y, Liu Q, Zhou Z, Ikeda Y. PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. *Stem Cell Res Ther* 8(1): 240, 2017.
26. Schulz TC, Young HY, Agulnick AD, Babin MJ, Baetge EE, Bang AG, et al. A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. *PLoS One* 7(5): e37004, 2012.
27. Millman JR, Xie C, Van Dervort A, Gurtler M, Pagliuca FW, Melton DA. Generation of stem cell-derived beta-cells from patients with type 1 diabetes. *Nat Commun* 7: 11463, 2016.
28. Docherty FM, Sussel L. Islet Regeneration: Endogenous and Exogenous Approaches. *Int J Mol Sci* 22(7), 2021.
29. Testera AM, Girotti A, de Torre IG, Quintanilla L, Santos M, Alonso M, et al. Biocompatible elastin-like click gels: design, synthesis and characterization. *J Mater Sci Mater Med* 26(2): 105, 2015.
30. Gonzalez de Torre I, Santos M, Quintanilla L, Testera A, Alonso M, Rodriguez Cabello JC. Elastin-like recombinamer catalyst-free click gels: characterization of proelastic and intrinsic viscoelastic properties. *Acta Biomater* 10(6): 2495-2505, 2014.
31. Girotti A, Reguera J, Rodriguez-Cabello JC, Arias FJ, Alonso M, Matestera A. Design and bioproduction of a recombinant multi(bio)functional elastin-like protein polymer containing cell adhesion sequences for tissue engineering purposes. *J Mater Sci Mater Med* 15(4): 479-84, 2004.