

Cecilia Annerén, PhD, postdoktor, Department of molecular and cellular biology, Harvard University, Cambridge, USA
(anneren@fas.harvard.edu)

Tillväxt av insulinproducerande betaceller

Kanske en väg att behandla typ 1-diabetes

■ Diabetes är en kronisk sjukdom som kännetecknas av en otillräcklig betacellsmassa eller -funktion för att hålla blodsockernivåerna i schack. Betacellsförlusten vid typ 1-diabetes (insulinberoende diabetes mellitus) beror på en selektiv destruktion av betacellerna i endokrina pankreas och en begränsad förmåga att regenerera nya insulinproducerande celler för att kompensera för denna förlust.

Betacellsdestruktionen pågår sannolikt i månader eller år och karakteriseras av att immunceller (makrofager, monocyter och T-celler) invaderar de langerhanska öarna och utsöndrar cytotoxiska ämnen (cytokiner och fria radikaler) som selektivt dödar de känsliga betacellerna [1-4].

När symtomen på diabetes uppträder är flertalet betaceller (ca 80 procent) redan försvunna. Trots mycket forskning kring sjukdomen finns idag inget registrerat läkemedel som kan stoppa eller ens bromsa förloppet.

Genom en bättre förståelse för de mekanismer som styr betacellernas proliferation (celldelning), differentiering (utmognad/utveckling) och överlevnad kan man finna vägar att öka betacellsmassan hos den diabetes sjuka patienten.

I denna översiktsartikel sammanfattas några av de signalvägar som på senare tid visat sig vara av betydelse i regleringen av betacellernas tillväxt, med särskild fokusering på ett cytoplasmiskt tyrosinkinaser som nyligen identifierats.

Betingelser som aktiverar tillväxt av betaceller

Betacellsmassan kan expandera genom minskad betacellsdöd, ökad celldelning (hyperplasi), celltillväxt (hypertrofi) eller genom att omogna celler i pankreas differentieras till insulinproducerande celler (neogenes) (Figur 1). Betacellerna hos en vuxen individ är till stor del terminalt differentierade men bibehåller förmågan att regenerera ca 1-3 procent per dag [5]. Trots denna relativt låga basala tillväxtkapacitet kan betacellsmassan öka dramatiskt under vissa fysiologiska och patofysiologiska betingelser.

Betacellsmassan hos en frisk individ har normalt en direkt relation till kroppsvikt, dvs betacellsmassan är dynamisk och ökar eller minskar funktionellt och i storlek för att hålla blodsockret på en fysiologisk, hälsosam nivå. Även perifer insulinresistens leder oftast till ökad betacellsmassa. I kombination med att cellerna producerar mer insulin kompenseras det ökade behovet, och blodsockernivåerna kan hållas i schack.

SAMMANFATTAT

Insulinberoende diabetes (typ 1-diabetes) karakteriseras av en gradvis minskande betacellsmassa som ett resultat av dels selektiv destruktion av de insulinproducerande betacellerna i endokrina pankreas, dels begränsad förmåga att regenerera nya celler som kompensation för denna förlust.

År 2000 lyckades en grupp i Edmonton, Kanada, bota sju svårt sjuka patienter med typ 1-diabetes med hjälp av ö-cellstransplantation. Sedan dess har förhoppningarna varit stora att inom kort kunna erbjuda sådan behandling.

Med en bättre förståelse för de mekanismer som reglerar tillväxt av betaceller kan det bli möjligt att expandera kvarvarande betacellsmassa hos den diabetes sjuka. Dessutom ges möjligheter att skapa nya insulinproducerande celler som kan användas för transplantation.

Här sammanfattas ett flertal av de fysiologiska och patofysiologiska betingelser som leder till expansion av betacellsmassan. Några signalvägar av betydelse vid tillväxt av endokrina pankreas belyses också, särskilt diskuteras ett nyligen identifierat cytoplasmiskt tyrosinkinaser.

På liknande sätt leder det ökade kravet på insulin hos gravida kvinnor till betacellshypertrofi samt att fler betaceller undergår celldelning med en markant betacellshyperplasi som följd [6, 7]. Studier har visat att vissa hormoner som frisätts i högre koncentration och/eller vars receptorer ökar i antal under graviditeten, såsom tillväxthormon (GH, growth hormone), prolaktin och placentalt laktogen (PL), kan stimulera tillväxt av betaceller [6, 8-10]. Mot slutet av graviditeten och under laktationen frisätts i stället faktorer (t ex progesteron) som hämmar celldelning [11]. I kombination med ökad

Tabell I. Faktorer som stimulerar betacellstillväxt.

Grupp	Faktor	Referens
Tillväxtfaktorer/ hormoner	Insulin	[24]
	IGF-1, IGF-2 (insulin like growth factor)	[25, 26]
	PDGF (platelet derived growth factor)	[23, 26]
	HGF (hepatocyte growth factor)	[25, 46]
	EGF (epidermal growth factor)	[42, 51]
	Betacellulin	[49, 50]
	KGF (keratinocyte growth factor)	[51]
	FGF-2 (fibroblast growth factor)	[25]
	Prolaktin	[6-11]
	PL (placentalt laktogen)	[6-11]
	GH (growth hormone)	[6-11]
	Exendin-4	[46]
	Nikotinamid	[43]
Signalproteiner	SHB	[32, 37]
	GTK (gastrointestinal associated tyrosine kinase)	[31, 32]
	v-SRC	[22]
	IRS-2 (insulin receptor substrate-2)	[45]
	SV40 Tag (semian virus 40 large antigen)	[48]
Övrigt	Glukos	[16, 41, 44]
	Aminosyror	[16, 41]

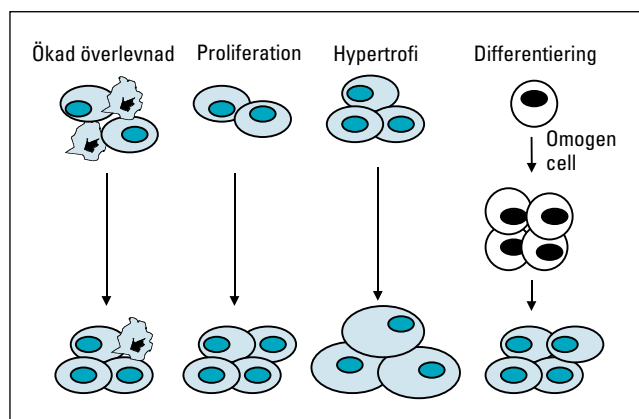
betacellsdöd återgår betacellsmassan till sin normala storlek efter förlossningen [12].

Pankreas kan även regenerera som svar på partiell pankreatektomi (då delar av organet avlägsnas). Redan två dagar efter operationen kan man i mus och råttor påvisa en ökad celledelning i hela pankreas [13, 14]. Betacellsmassan ökar dels genom proliferation av redan befintliga betaceller, dels genom neogenes då omogna celler i pankreas differentierar och bildar nya insulinproducerande celler [15].

Eftersom pankreas normalt kan känna av hur mycket insulin som behöver frisättas och eftersom höga glukosnivåer kan stimulera betacellproliferation [16] är det en naturlig slutsats att de förhöjda glukosvärdena orsakar den celledelning som induceras av partiell pankreatektomi.

Glukos kan dock inte vara den enda, eller ens den viktigaste, tillväxtfaktorn i sammanhanget: 60 procents pankreatektomi stimulerar regeneration i mus och råttor trots att blodglukosnivåerna påverkas endast om minst 90 procent avlägsnas.

En del forskning tyder på att pankreas blir mer mottaglig för mitogena stimuli efter partiell pankreatektomi [17]. Dessutom stimulerar operationen till transkription av ett flertal gener som är involverade i reglering av celledelning och/eller differentiering. Till exempel ökar mRNA-nivåerna för tillväxtfaktorer såsom VEGF (vascular endothelial growth factor) [18] och IGF-1 (insulin like growth factor) [19] samt ett fler-



Figur 1. Betacellsmassan kan expandera genom: (A) ökad överlevnad, dvs cellerna görs mera motståndskraftiga med mindre celledöd som följd; (B) ökad celledelning/proliferation; (C) hypertrofi, dvs ökad storlek hos den enskilda betacellen, samt (D) differentiering, dvs förstadier till betaceller i pankreas stimuleras till delning för att sedan mogna till insulinbildande och glukoskänsliga betaceller.

tal intracellulära signalproteiner, t ex RAF-1, H-RAS, KIRAS och c-MYC, vilka kan aktivera cellcykeln [20, 21].

Faktorer som stimulerar betacellstillväxt

Ett flertal tillväxtfaktorer och intracellulära proteiner kan stimulera delning av insulinproducerande celler (Tabell I).

Överuttryck av onkgenprotein v-SRC stimulerar DNA-syntes i primära betaceller [22]. Detsamma gäller om man överuttrycker PDGF-BB (platelet derived growth factor) tillsammans med dess receptor [23].

Om fetala öar från råttor odlas med VEGF ökar insulininnehållet i öarna [18]. Detta antas ske genom att VEGF inducerar proliferation av omogna celler och att dessa differentierar för att skapa nya mogna betaceller. Om man däremot odlar betaceller från vuxna råttor med höga halter av PDGF, FGF-2 (fibroblast growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), IGF-1, IGF-2 eller insulin stimuleras redan differentierade betaceller att proliferera [16, 24-26]. Gemensamt för alla dessa faktorer är dock att bara en liten fraktion av betacellerna stimuleras att dela sig, flertalet betaceller tycks vara terminalt differentierade och därmed förhindrade från celledelning.

Tyrosinkinaset GTK stimulerar tillväxt av betaceller

Proteintyrosinkinaser är enzymer som är involverade i cellsignalering och som finns i alla flercelliga organismer. Gemensamt för alla medlemmar i tyrosinkinasefamiljen är att de kan fosforylera proteiner på aminosyran tyrosin. GTK (gastrointestinal associated tyrosine kinase), ett cytoplasmiskt tyrosinkinastillhörande samma familj som proto-onkgenproteinet SRC, upptäcktes 1996 och finns uttryckt i langerhanska öar i mus och råttor [27]. GTK samt dess humana homolog, FRK/RAK, karakteriserades först som potentiella tumörsuppressorer, eftersom de hämmade celledelning när de överuttrycktes i tumörceller [28-30].

För att utröna betydelsen av GTK för tillväxt av betaceller genererades en transgen mus som transkriberade GTK under kontroll av insulinpromotorn, dvs GTK uttrycktes bara i betacellerna. Förvånande nog hade dessa möss en näst intill fördubblad betacellsmassa i jämförelse med kontrollmössen [31]. Förutom att öka andelen betaceller i pankreas stimulerade GTK tillväxt av hela bukspottkörteln i de transgena djuren.

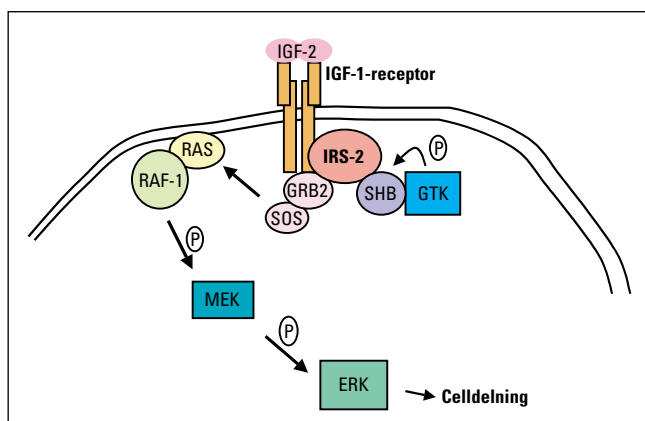
När 60 procents pankreatektomi utfördes på mössen stimulerade GTK dessutom betacellernas delningshastighet (en

ANNONS

ANNONS

ANNONS

ANNONS



Figur 2. Hypotetisk modell för hur GTK (gastrointestinal associated tyrosine kinase) och IGF-2 (insulin-like growth factor-2) använder samma signalväg för att stimulera nybildning av betaceller. IGF-2 binder till IGF-1-receptorn som aktiveras att fosforilera (P) IRS-2 (insulin receptor substrate-2). IRS-2 associerar då med GRB2/SOS (growth factor receptor-bound protein-2/son of sevenless), vilket i sin tur aktiverar ERK (extracellular signal-regulated kinase) via RAS, RAF-1 och MEK (MAP kinase kinase), även kallad MAPK-vägen (mitogen-activated protein kinase). GTK aktiverar MAPK-vägen genom att associera med och fosforilera adapterproteinet SHB som då kan binda till IRS-2.

fördubbling jämfört med kontrolldjuren fyra dygn efter operationen), vilket tyder på att GTK kan stimulera betacellstillväxt in vivo [32].

Eftersom GTK är ett intracellulärt protein och transgenen uttrycks enbart i betacellerna var det oväntat att GTK skulle påverka även den totala pankreasvikten. Likheter mellan de GTK-transgena mössen och en transgen mus som uttrycker IGF-2 under kontroll av insulinpromotorn kan dock ge en möjlig förklaring till detta fenomen. IGF-2-transgena möss har nämligen också en större pankreas i kombination med större andel betaceller, men IGF-2-nivåerna i blodet hos dessa möss är ej förhöjda [33]. Orsaken till den förstorade bukspottkörteln förklaras i stället med att IGF-2, autokrint eller parakrint, kan stimulera celledelning i öarna, vilket leder till betacellshyperplasi med en ökad insulinfrisättning som följd.

Insulin är i sig en tillväxtfaktor som lokalt kan stimulera pankreastillväxt, men de förhöjda insulinivåerna i blodet hos de IGF-2-transgena mössen orsakar även perifer insulinresistens, vilket leder till ytterligare betacellstillväxt (se ovan).

Kan GTK inducera en liknande kaskad? Nya, ännu opublikerade data tyder på att de GTK-transgena mössen har en lätt perifer insulinresistens samt nedsatt insulinsekretion som svar på glukos. Detta tyder på att den ökade pankreasvikten kan vara en sekundär effekt av GTK-inducerad betacellstillväxt i likhet med vad man observerat med IGF-2.

IGF-2 stimulerar celledelning genom att binda till IGF-1-receptorn som fosforilerar IRS-2 (insulin receptor substrate-2). Detta leder till att MAP-kinasvägen aktiveras och cellcykeln slås på (Figur 2). Möss som saknar uttryck av IRS-2 (IRS-2-knockout), är insulinresistenta, har minskad betacellsmassa och utvecklar diabetes vid tio veckors ålder, vilket tyder på att IRS-2 är en mycket viktig faktor för betacellstillväxt som kompensation för perifer insulinresistens [34].

Det är ännu inte kartlagt hur GTK stimulerar tillväxt. Ökad basal fosforilering av IRS-2 samt förhöjd MAP-kinasaktivitet, som uppmäts i öar isolerade ifrån de transgena djuren, antyder dock att GTK kan använda sig av samma signalväg som IGF-2 för att framkalla proliferation av betaceller [31, 35]. En möjlig länk mellan GTK och IRS-2 är ett så kallat adapterprotein som fått beteckningen SHB. GTK kan binda till och fosforilera SHB, och SHB kan i sin tur binda till IRS-2 [opublikerade

data]. Även transgena möss som överuttrycker SHB i betaceller visar ökad betacellsmassa samt ökad celledelning som svar på pankreatektomi [32, 36].

GTK kan inducera betacellsdöd

GTK och SHB kan även ha negativa effekter på betacellsmassan under patofysiologiska betingelser. Öar som isolerats från transgena möss och som behandlas med inflammatoriska cytokiner (IL-1 β och INF- γ) är mer känsliga än öar från kontrollmöss; massiv celledöd påvisas efter två dygn [31, 37].

På liknande sätt är de transgena mössen mer känsliga för det betacellsspecifika toxinet streptozotocin (STZ) än kontrollmöss, vilket visar sig genom att blodglukosnivåerna går upp och att djuren får försämrad glukostolerans [32].

Trots att GTK och SHB kan både öka och minska betacellsmassan tyder resultaten på att de negativa signaler som GTK och SHB aktiverar är starkare eller har förtur framför de tillväxtstimulerande signalvägar som också kan induceras av dessa proteiner. Det har bl a visats att GTKs och SHBs förmåga att stimulera celledelning efter partiell pankreatektomi försvinner i möss som först behandlats med STZ [32].

Ö-cellstransplantation i stor klinisk prövning

I denna artikel har jag sammanfattat delar av den kunskap som växt fram i sökandet efter faktorer som kan stimulera betacellstillväxt. Forskning inom detta område kan förhoppningsvis leda till nya läkemedel eller behandlingsformer för diabetesjuka. En möjlig behandlingsform är att aktivera betacellsspecifika signalvägar som kan stimulera endogen betacellstillväxt hos den sjuka patienten. Detta skulle kunna ske genom tillförel av läkemedel eller genom genterapi.

En idag kanske mer trolig behandling är i stället transplantation av insulinproducerande celler som expanderats in vitro. Försök att transplantera langerhanska öar var länge fruktlösa på grund av den kraftiga avstötningmekanismen. År 2000 lyckades dock en grupp i Edmonton, Kanada, bota sju svårt sjuka patienter med typ 1-diabetes med hjälp av ö-cellstransplantation. Sedan dess har förhoppningarna varit stora att inom kort kunna erbjuda sådan behandling [38].

Det som i Edmontonprotokollet, som i stora drag går ut på att transplantera stora mängder öar i kombination med immun-suppressiv behandling fri från steroider, är nu fokus för en stor internationell klinisk prövning [39]. Dessutom har ett nordiskt projekt, som samordnas från Uppsala, hittills lett till att fem patienter framgångsrikt transplanterats.

För att bota en enda patient krävs dock flera donatorer av langerhanska öar. Eftersom tillgången på bukspottkörtlar från hjärmdöda givare är begränsad, är cellstransplantation en metod som bara kan erbjudas en liten grupp patienter. Det är därför uppenbart att en av dagens stora utmaningar är att finna vägar att framställa stora mängder funktionsdugliga betaceller som kan användas för transplantation.

Eftersom betacellerna i den vuxna individen är terminalt differentierade, har tillväxtfaktorer ofta en begränsad förmåga att stimulera proliferation av dessa. Man har därför prövat att dedifferentiera betaceller så att de återfår förmågan att dela sig. Detta tillvägagångssätt för att expandera betaceller skapar emellertid problem. De dedifferentierade cellerna förlorar en del av sin funktion och producerar mindre insulin. Risken är att man skapar en ny typ av diabetes som till stor del påminner om typ 2-diabetes. Dessutom ökar risken för tumörbildning om inte tillväxten strikt kan regleras.

vilka faktorer som är av betydelse för utvecklingen av betaceller från dess tidiga förstadium är ännu inte kartlagt, och frågan har därför inte diskuterats här. Stora förväntningar knyts nu till den nya stamcells forskning som försöker utrona hur en stamcell kan bli en insulinproducerande betacell.

Om det blir möjligt att styra stamcellerna kan det vara en lösning för bristen på transplantationsmaterial. Förutom embryonala stamceller kan även stamceller från vuxna individer användas. Man har t ex nyligen lyckats isolera stamceller från benmärg som kan differentiera till bl a leverceller, muskler och nervvävnad [40]. Fördelen är att man kan undvika immunsuppressiv behandling om stamcellerna isolerats från den patient som skall transplanteras.

Avgörande frågor återstår

Ett problem med att enbart fokusera på att expandera betacellsmassan är risken för autoimmun destruktions och återfall i sjukdomen när cellerna utsätts för den diabetiska miljön. De transplanterade betacellerna måste kunna motstå den autoimmune attacken, t ex genom ökad motståndskraft mot de cytotoxiska ämnen som immuncellerna frisätter.

Vid studier av ämnen som stimulerar betacellstillväxt/-differentiering är det därför viktigt att i detalj utvärdera övriga funktioner som sådana ämnen kan ha. GTK och SHB visade sig t ex förvärra den celldöd som uppkommer vid tillförsel av cytotoxiska ämnen och är därmed inte lämpliga kandidater för att stimulera tillväxt av betaceller hos patienter.

På liknande sätt har GH, trots sin tillväxtstimulerande effekt under graviditeten, ansetts vara ett pro-diabetiskt hormon eftersom det har motsatt effekt mot insulin i glukosmetabolismen och därmed kan inducera insulinresistens och hyperglykemi [10].

Avslutningsvis: Ökade kunskaper om hur betacellernas tillväxt och överlevnad regleras kan leda till effektiv och skonsam behandling av typ 1-diabetes. Ännu måste dock en del frågeställningar besvaras innan målet kan nås:

- Kan vi stimulera betacellstillväxt utan att inducera insulinbildande tumörer, försämra betacellernas funktion eller påverka deras överlevnad?
- Kan vi transplantera betaceller utan att samtidigt behöva tillgripa kronisk immunsuppressiv behandling?
- Kan vi från stamceller skapa en homogen population funktionella betaceller utan inslag av andra celltyper?

*

Delar av den presenterade forskningen har utförts vid institutionen för medicinsk cellbiologi vid Uppsala universitet. Manuskriptet har granskats av professor Michael Welsh och professor Claes Hellerström.

Referenser

1. Sjöholm Å. Interleukin-1 och kväveoxid inblandade i uppkomsten av diabetes. *Läkartidningen* 1999;96:2338-41.
2. Mauricio D, Mandrup-Poulsen T. Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death. *Diabetes* 1998;47:1537-43.
4. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Cytokines and their roles in pancreatic islet β -cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol* 1998;55:1139-49.
5. Swenne I. Effects of aging on the regenerative capacity of the pancreatic β -cell of the rat. *Diabetes* 1983;32:14-9.
10. Nielsen JH, Svensson C, Galsgaard ED, Møldrup A, Billestrup N. Beta cell proliferation and growth factors. *J Mol Med* 1999;77:62-6.
13. Brockenbrough JS, Weir GC, Bonner-Weir S. Discordance of exocrine and endocrine growth after 90% pancreatectomy in rats. *Diabetes* 1988;37:232-6.
15. Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT, Smith FE. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 1993;42:1715-20.
16. Swenne I. Pancreatic beta-cell growth and diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992;35:193-210.
20. Silverman JA, Kuhlmann ET, Zurlo J, Yager JD, Longnecker DS. Expression of c-myc, c-raf-1, and c-Ki-ras in azaserine-induced pancreatic carcinomas and growing pancreas in rats. *Mol Carcinog* 1990;3:379-86.

22. Welsh M, Welsh N, Nilsson T, Arkhammar P, Pepinsky RB, Steiner DF, et al. Stimulation of islet β -cell replication by oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:116-30.
27. Öberg-Welsh C, Welsh M. Cloning of BSK, a murine FRK homologue with a specific pattern of tissue distribution. *Gene* 1995; 152:239-42.
28. Annerén C, Welsh M. Role of the Bsk/Iyk non-receptor tyrosine kinase for the control of growth and hormone production in RINm5F cells. *Growth Factors* 2000;17:233-47.
31. Annerén C, Welsh M. Increased cytokine-induced cytotoxicity of pancreatic islet cells from transgenic mice expressing the Src-like tyrosine kinase GTK. *Mol Med* 2001;7:301-10.
32. Annerén C. Dual role of the tyrosine kinase GTK and the adaptor protein SHB in β -cell growth: enhanced β -cell replication after 60% pancreatectomy and increased sensitivity to Streptozotocin. *J Endocrinol* 2002;172:145-53.
33. Devedjian J, George M, Casellas A, Pujol A, Visa J, Pelegrin M, et al. Transgenic mice overexpressing insulin-like growth factor-II in β cells develop type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2000;105:731-40.
34. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998; 391:900-4.
37. Welsh M, Christmansson L, Karlsson T, Sandler S, Welsh N. Transgenic mice expressing Shb adaptor protein under the control of rat insulin promoter exhibit altered viability of pancreatic islet cells. *Mol Med* 1999;5:169-80.
38. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000;343:230-8.
44. Swenne I, Bone AJ, Howell SL, Hellerström C. Effects of glucose and amino acids on the biosynthesis of DNA and insulin in fetal rat islets maintained in tissue culture. *Diabetes* 1980;29:686-92.
45. Withers DJ, Burks DJ, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nature Genet* 1999;23:32-40.

I Läkartidningens elektroniska arkiv
<http://tarkiv.lakartidningen.se>
 är artikeln kompletterad med fullständig referenslista.

SUMMARY

Growth of insulin-producing beta cells
 Perhaps a new way to treat type 1 diabetes

Cecilia Annerén

Läkartidningen 2002;99:2394-9

Insulin dependent diabetes mellitus (type 1-diabetes) results from a selective destruction of the insulin producing beta cells and a limited capacity of the remaining cells to regenerate in a compensatory manner. Increased knowledge of the factors involved in the regulation of beta-cell growth may lead to new ways of forming beta cells that in combination with selective immunosuppression could be used for treatment of type 1 diabetes. Physiological and pathophysiological conditions that induce beta-cell growth, different factors that have been implicated to regulate these processes and future perspectives concerning treatment of type 1 diabetes by expanding the beta-cell mass is discussed in this review article.

Correspondence: Cecilia Annerén, Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University, Cambridge, USA (anneren@fas.harvard.edu)