

Состояние и перспективы применения генной терапии в лечении сахарного диабета 1 типа

Н.Д. Тронько,
Е.И. Ковзун

Государственное учреждение «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины»

Резюме. В обзоре представлены современные данные и перспективы использования генной терапии в лечении сахарного диабета 1 типа, рассмотрены методы доставки генов, проведена оценка безопасности применения генной терапии и биологической активности таких средств.

Ключевые слова: сахарный диабет, стрептозотоциновый диабет, генная терапия, векторы доставки генов.

Современные разработки по терапии сахарного диабета (СД) ведутся фактически по двум направлениям: применение генно-инженерных технологий и усовершенствование методов трансплантации бета-клеток, полученных путем направленной дифференциации эмбриональных стволовых клеток.

Генная терапия – это метод введения фрагмента ДНК в клетки пациента с целью замещения функции мутантного гена и лечения наследственных болезней. Еще в конце 60-х годов прошлого столетия было выяснено, что клетки животных и человека способны встраивать экзогенную ДНК в свой геном, после чего наблюдается экспрессия введенных генов, в частности, в виде синтеза отсутствовавших ранее белков и ферментов.

По данным Международной диабетической

федерации, к 2030 г. в мире будет насчитываться около 552 млн больных диабетом [1]. Радикальное лечение больных СД 1 типа можно осуществить с помощью генной терапии – введения больному гена инсулина в составе молекулярной конструкции, которая обеспечит его синтез и секрецию в неспецифических клетках.

В настоящее время разработаны методы доставки ДНК в клетки с помощью вирусов и других носителей. Во многих методиках в качестве носителей генов используются ретровирусы, у которых отсутствуют практически все гены, характерные для вирусов, за исключением тех, которые необходимы для его проникновения в клетки [2]. Применение ретровирусов имеет несколько существенных ограничений: возможность абсорбции генов, ограниченных по своим размерам, и способность инфицировать только делящиеся клетки, а у взрослых пациентов клетки находятся в основном в стадии покоя. Ретровирусы способны инфицировать любую клетку и вместе

* адреса для листування (Correspondence): ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна; e-mail: zdovado@ukr.net

КЛІНІЧНІ ТА ФУНДАМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

с необходимым фрагментом ДНК легко включаются в геном клетки-хозяина ДНК.

Аденовирусы являются вторыми по частоте использования в качестве векторов для генной терапии [3, 4]. В отличие от ретровирусов, они могут инфицировать и неделящиеся клетки. Ограничения метода: инфицирование всех тканей, включая половые клетки и способность таким образом влиять на наследственность; более сложная структура генома, что повышает вероятность инфицирования пациента патогенным штаммом вируса.

Одной из основных проблем генной терапии является доставка в организм векторов, содержащих целевой ген. Невирусные методы переноса генов являются наиболее безопасными [5]. При использовании сконструированного плазмидного вектора, содержащего полноразмерный ген препроинсулина человека, анализ гено- и цитотоксичности трансфекционных препаратов ДНК подтвердил безопасность используемого метода. Конструкция вектора представляла собой бактериальную плазмиду, содержащую кассету для экспрессии целевого гена, фланкированную инвертированными терминальными повторами аденоассоциированного вируса [6].

В подавляющем большинстве публикаций по генной терапии СД речь идет о доставке в клетки печени модифицированного гена инсулина [7, 8]. Генетически измененные клетки печени способны становиться продуцентами инсулина. Клетки печени с кДНК инсулина человека при специальном контроле цитомегаловирусного промотера секретировали проинсулин человека, который накапливался в гранулах цитозоля клеток и секретировался в ответ на изменение уровня глюкозы в окружающей среде. Такие клетки продолжали секретировать инсулин после их трансплантации диабетическим мышам в количестве, необходимом для поддержания эугликемического состояния животных.

Поскольку клетки печени не вырабатывают конвертазы островковых прогормонов Pс1/3 и Pс2, многие исследователи оценивали возможность протеолитического расщепления молекулы проинсулина при взаимодействии с фурином – протеазой, присутствующей во многих тканях, включая клетки печени. Альтернативно ген инсулина можно модифицировать для кодирования инсулина с одной цепью, который обладает 20-40% активности

нормального зрелого инсулина. Используются различные чувствительные к глюкозе промотеры (фосфоэнолпируват-карбоксикиназы, L-пируваткиназы, глюкозо-6-фосфатазы и других генов), которые позволяют осуществлять регуляцию транскрипции гена инсулина в течение нескольких часов после повышения уровня гликемии. Усиление синтеза и секреции инсулина при нормальном или низком уровне сахара в крови является медленным процессом. Из-за отставания в секреторной реакции, гликемический контроль транскрипционно регулируемые трансгенами инсулина является неустойчивым, а гипогликемия – значительным осложнением.

В экспериментах на грызунах показана возможность применения генной терапии стрептозотцин-индуцированного диабета [9]. Векторная конструкция содержит 2 модуля: последовательность бактериальной плазмиды, что позволяет реплицироваться в *Escherichia coli*, и кассеты с целевым геном, содержащие повторы аденовируса человека. Для экспрессии гена препроинсулина человека использовался промотер ранних генов цитомегаловируса человека. Для усиления экспрессии целевого трансгена в кассету субклонирован энхансер 1 вируса гепатита В. В результате однократной генной терапии наблюдается снижение гипергликемии у экспериментальных животных, при этом динамика нормализации гликемии зависит от дозы препаратов ДНК [6, 9].

Помимо гена инсулина, применяется перенос других генов для снижения уровня сахара в крови. Имеется два типа неинсулиновых трансгенов, которые могут использоваться для снижения уровня сахара крови: трансгены, подавляющие продукцию глюкозы в печени, а также усиливающие утилизацию глюкозы печенью или скелетной мышцей.

К первой группе относится ген глюкокиназы. Хотя ген глюкокиназы отнесен к категории трансгенов, снижающих продукцию глюкозы в печени, его перенос в высокой дозе вызывает гиперлипидемию и ожирение печени [10]. Перенос гена регуляторного протеина глюкокиназы вызывает очень сходный эффект с переносом гена глюкокиназы. Мутантная форма 6-фосфофрукто-2-киназы/фруктозо-2,6-бифосфатазы применялась для активации фосфофруктокиназы-1 и для одновременного подавления фруктозо-1,6-бифосфатазы для регуляции глюконеогенеза. Показано, что его

надэкспрессия влияет на уровень глюкозо-6-фосфатазы, на которую влияет уровень глюкокиназы, стимулируя доступность глюкозы и подавляя продукцию глюкозы печенью у мышей с СД [11]. Другим путем регуляции продукции глюкозы печенью является превращение глюкозы в гликоген путем надэкспрессии протеина РТG, который относится к протеинфосфатазам-1, регулирующим обмен гликогена. Аденовирус-опосредованный перенос РТG стимулирует синтез гликогена в печени и снижает сахар крови у крыс, что подтверждает возможность терапевтического подхода к генной терапии СД. Как ранее упоминалось, надэкспрессия глюкокиназы в гепатоцитах усиливает утилизацию глюкозы и является, таким образом, одним из потенциальных терапевтических генов, стимулирующих доступность глюкозы. Интересно, что надэкспрессия глюкокиназы в скелетной мышце также стимулирует доступность глюкозы и снижает гипергликемию при стрептозотоциновом диабете у крыс [12]. Таким образом, генная терапия различными типами генов, влияющими на продукцию и утилизацию глюкозы, принципиально возможна.

В последние годы начато исследование индуцированного генной терапией неогенеза островков как метода лечения СД. По сравнению с доставкой гена инсулина индукция образования новых островковых бета-клеток имеет много потенциальных преимуществ. Индуцирование новых бета-клеток (либо в поджелудочной железе, либо в печени) проводилось в различных лабораториях. Для понимания целесообразности лежащего в основе индуцированного генной терапией неогенеза островков как вида лечения, необходимо кратко остановиться на развитии поджелудочной железы и панкреатических островков. Развитие поджелудочной железы в процессе эмбриогенеза происходит в результате клеточной дифференцировки с участием различных факторов транскрипции: Pdx1, Hnx, Hlxb9, Sox9, IS11, Ptf1a, Hes1 и Oc1 [13, 14]. Четкая мультипотентная популяция прогениторных клеток в развивающейся поджелудочной железе, являющаяся Pdx1+, Ptf1a+, cMyc High CPA1+, в конечном счете, вырабатывает экзокринные, эндокринные клетки и клетки протоков [13].

По мере развития вентральных и дорсальных панкреатических зачатков в них инициируется развитие специфических эндокринных

клеток транскрипционным фактором нейрогенином 3 (Ngn3) в пределах домена Pdx1-положительных клеток [15, 16]. Это приводит к появлению островков Лангерганса, которые, в конечном счете, продуцируют гормоны, контролирующие гомеостаз глюкозы, в том числе инсулин бета-клеток.

В первую очередь как экзокринную, так и эндокринную функцию поджелудочной железы определяет экспрессия фактора транскрипции Pdx-1. Были проведены исследования по введению аденовируса 1-го поколения, экспрессирующего Pdx-1, мышам со стрептозотоциновым СД. Показано, что уровень сахара крови снижается на протяжении 10 дней, что объясняется индукцией редких инсулин-положительных клеток в печени. Трансгенная экспрессия Pdx-1 в альбумин-продуцирующих клетках в печени может приводить к гипербилирубинемии и дисморфогенезу печени в результате сопутствующей продукции экзокринных ферментов (эластазы и химотрипсина) в клетках печени, также экспрессирующих инсулин. Может иметь место также коэкспрессия трипсина в инсулин-продуцирующих клетках печени. Экспрессии Pdx-1 в печени сопутствует продукция экзокринных ферментов, которая может приводить к гепатиту, вызванному эктопической продукцией панкреатического фермента при отсутствии нормальной системы панкреатических протоков для отвода локально продуцируемых пищеварительных ферментов в кишечник [15]. Таким образом, применение ростового фактора Pdx-1 как единственного трансгена не является лучшей стратегией для индуцирования бета-клеток в печени *in vivo*.

Идентификация ключевых факторов транскрипции, определяющих эмбриональное развитие островков, может позволить направленно регулировать дифференцировку эмбриональных стволовых клеток путем обработки растворимыми факторами для повышения количества клеток-предшественников, подверженных дифференцировке с образованием физиологически регулируемых инсулин-продуцирующих клеток. В то же время, дифференцировка сопровождается снижением пролиферативной способности клеток. Таким образом, необходимо ограничивать нерегулируемый клеточный рост после трансплантации.

Ngn3 инициирует запуск каскада транскрипционных факторов, в т.ч. Neurod1, Pax6,

КЛІНІЧНІ ТА ФУНДАМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Is11, Pax4, Nkx2.2, Nkx6.1 и MafA в бета-клетках, и Arx и Brn4 – в глюкагон-секретирующих альфа-клетках. Предполагается, что индуцированная экспрессия некоторых из этих транскрипционных факторов может обусловить дифференцирование клеток-мишеней в клетки островков Лангерганса. При попытках использования поджелудочной железы как органа-мишени для индуцирования островкового неогенеза исследователи натолкнулись первоначально на техническую трудность при введении гена в определенный тип клетки-мишени. Аденовирусные векторы можно использовать для переноса гена в поджелудочную железу либо ретроградно через панкреатический проток, либо внутривенной инъекцией через системное кровообращение, или через вену 12-перстной кишки. В отличие от поджелудочной железы печень является намного более доступной мишенью для различных векторов, например аденовирус «естественным путем» эффективно нацеливается на печень [3], доставка гена в гепатоциты может осуществляться почти для любого вектора путем применения катетера, через печеночную артерию или воротную вену.

Использование транскрипционных факторов Ngn3, Neurod1 и MafA как в отдельности, так и в сочетании с Pdx-1, приводило к снижению уровня сахара в крови у мышей с СД. Показано, что такой же эффект имела доставка в клетки печени векторов гибридного аденоассоциированного вируса (AAV) и носителей Ngn3, Neurod1 и MafA в комбинации с Pdx-1. При использовании модифицированной версии Pdx-1, включающей домен белка вируса трансактивазии «herpes simplex VP-16», было отмечено, что при доставке вместе с транскрипционными факторами Ngn3 или Neurod1 модифицированный Pdx-1 эффективно снижал гипергликемию у мышей с экспериментальным СД [17].

Обнадеживающие результаты получены в результате доставки Neurod1 в составе конструкции с аденоассоциированным вирусом у мышей со стрептозотоциновым СД. Введение индуцировало появление кластеров инсулин-продуцирующих клеток в печени, полную инверсию гипергликемии и восстановление нормального уровня инсулина в плазме и толерантности к глюкозе на протяжении нескольких месяцев [15]. Клетки печени, выделенные после терапии, проявляли функции

панкреатических бета-клеток, включая глюкозо-стимулированную секрецию инсулина. Однако инсулин-положительные клетки совместно экспрессировали другие островковые гормоны, в отличие от взрослых островковых клеток, каждая из которых обычно экспрессирует только один гормон. Количество островковых клеток, экспрессирующих несколько островковых гормонов, заставляет думать, что они являются незрелыми островковыми клетками, поскольку инсулин-глюкагон-продуцирующие клетки чаще всего наблюдаются в процессе развития эмбриональных островков.

Важным терапевтическим подходом при СД является влияние на иммунную систему, поскольку СД 1 типа является аутоиммунным заболеванием. Иммунная модуляция путем индуцирования толерантности к известным антигенам или экспрессии протеинов, связанных с аутоиммунно-резистентным генотипом, предупреждала возникновение СД у мышей без ожирения (NOD). В этих исследованиях GADA (декарбоксилаза глютаминовой кислоты - аутоантиген), перенесенная в конструкции с аденоассоциированным вирусным вектором внутримышечно, а затем перенесенная в NOD мышь с предиабетом, достоверно снижала заболеваемость СД у леченых мышей путем устранения аутореактивных Т-клеток и усиления защитных супрессорных Т-регуляторных (Treg) клеток [18]. Аналогично, проинсулин, соединенный с В-токсином холеры и экспрессированный рекомбинантным вирусом у NOD мышей с предиабетом, достоверно снижал заболеваемость СД [19].

Еще один подход генной терапии связан с попыткой изменения иммунного ответа путем влияния интерлейкинов IL-10, IL-4 и TGF-бета на Т-клетки. Системная надэкспрессия IL-10, введенного в виде одноразовой внутримышечной инъекции с помощью рекомбинантного AAV вектора, индуцирует Treg (CD4+ и CD25+) клетки *in vivo* и предупреждает развитие СД у NOD мышей [20-22]. Интересно, что генная терапия у диабетических NOD мышей с помощью TGF-бета не только индуцирует регенерацию нативных панкреатических островков, но также защищает островки после трансплантации от разрушения в результате аутоиммунных процессов [23]. Подход при помощи инфицирования дендритных клеток аденовирусом-носителем IL-4 [24, 25] или преобразования антиген-специфических Т-клеток в

Treg путем ретровирусной трансдукции Treg-определяющим транскрипционным фактором FoxP3 [26,27] *ex vivo* и последующей их инфузии NOD-мышам с предиабетом оказался эффективным способом предупреждения СД.

Таким образом, целью генной терапии СД 1 типа является восстановление синтеза и секреции инсулина бета-клетками. Наиболее успешным подходом является образование новых инсулин-продуцирующих клеток с участием панкреатических транскрипционных факторов. Иммунная деструкция островковых клеток при СД 1 типа также определяет поиск новых путей подавления аутоиммунитета для защиты вновь образованных бета-клеток. Хотя механизмы этих явлений еще до конца не ясны, подтверждение таких предположений может открыть перспективу для единого терапевтического подхода, направленного как на замещение клеток, так и на предупреждение возвратного аутоиммунитета. Результаты экспериментов свидетельствуют о возможности образования бета-клеток в результате генной терапии, однако многие аспекты применения генной терапии СД 1 типа требуют дальнейших углубленных исследований.

Важнейшей проблемой практического применения генной терапии является контроль над экспрессией генов. При большинстве заболеваний регулирование функции введенного гена очень желательно, т.к. непрерывная его экспрессия может нанести вред пациенту или создать угрозу для его жизни.

Ограниченные возможности проведения клинических испытаний связаны с тем, что лишь небольшое число вирусов-переносчиков генов разрешены к применению в исследованиях на людях. Несмотря на перспективность направления, от генной терапии не следует ожидать быстрого решения проблемы лечения наследственных и приобретенных заболеваний.

Литература

1. Diabetes Atlas. 5th ed. International Diabetes Federation; 2011.
2. Furlan R., Butti E., Pluchino S., Martino G. Gene therapy for autoimmune diseases // *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2004, 6, N 5, 525-536.
3. Zaia J.A. The status of gene vectors for the treatment of diabetes // *Cell. Biochem. Biophys.* 2007, 48, N 2-3, 183-190.
4. D'Anneo A., Rood P., Bottino R. et al. Gene therapy for type 1 diabetes: is it ready for the clinic? // *Immunol. Res.* 2006, 36, N 1-3, 83-89.
5. Prud'homme G.J., Draghia-Akli R., Wang Q. Plasmid-based gene therapy of diabetes mellitus // *Gene Ther.* 2007, 14, N 7, 553-564.
6. Топорова Е.К., Гулько Т.П., Сухорада Е.М. и др. Экспериментальная генная терапия сахарного диабета 1-го типа // *Журнал АМН Украины.* 2010, 16, додаток, 170-171.
7. Bagley J., Paez-Cortez J., Tian C., Iacomini J. Gene therapy in type 1 diabetes // *Crit. Rev. Immunol.* 2008, 28, N 4, 301-324.
8. Harrison P.T. Application of gene therapy in diabetes care // *Infect. Disord. Drug. Targets.* 2008, 8, N 2, 129-133.
9. Топорова О.К., Гулько Т.П., Кордюм В.А., Трощко М.Д. Терапевтичні ефекти, обумовлені введенням гена препроінсуліну людини мишам з експериментальним цукровим діабетом 1-го типу // *Ендокринологія.* 2010, 15, додаток, 72.
10. Iynedjian P.B. Molecular physiology of mammalian glucokinase // *Cell. Mol. Life Sci.* 2009, 66, N 1, 27-42.
11. Matschinsky F.M., Zelent B., Doliba N.M. et al. Research and development of glucokinase activators for diabetes therapy: theoretical and practical aspects // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2011, 203, 357-401.
12. Yang R., Newgard C.B. Hepatic expression of a targeting subunit of protein phosphatase-1 in streptozotocin-diabetic rats reverses hyperglycemia and hyperphagia despite depressed glucokinase expression // *J. Biol. Chem.* 2003, 278, N 26, 23418-23425.
13. Chen T.H., Yeh C.T., Ho Y.P., et al. Hydrodynamics-based transfection of pancreatic duodenal homeobox 1 DNA improves hyperglycemia and is associated with limited complications in diabetic mice // *Endocr. J.* 2009, 56, N 6, 783-790.
14. Li Y.G., Ji D.F., Zhong S. et al. Hybrid of 1-deoxynojirimycin and polysaccharide from mulberry leaves treat diabetes mellitus by activating PDX-1/insulin-1 signaling pathway and regulating the expression of glucokinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase in alloxan-induced diabetic mice // *J. Ethnopharmacol.* 2011, 134, N 3, 961-970.
15. Yechoor V., Liu V., Espiritu C. et al. Neurogenin3 is sufficient for transdetermination of hepatic progenitor cells into neo-islets in vivo but not transdifferentiation of hepatocytes // *Dev. Cell.* 2009, 16, N 3, 358-373.
16. Yechoor V., Liu V., Paul A. et al. Gene therapy with neurogenin 3 and betacellulin reverses major metabolic problems in insulin-deficient diabetic mice // *Endocrinology.* 2009, 150, N 11, 4863-4873.
17. Kaneto H., Nakatani Y., Miyatsuka T. et al. PDX-1/VP16 fusion protein, together with NeuroD or Ngn3, markedly induces insulin gene transcription and

КЛІНІЧНІ ТА ФУНДАМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

- ameliorates glucose tolerance // *Diabetes*. 2005, 54, N 4, 1009-1022.
18. Michels A.W., Eisenbarth G.S. Immune intervention in type 1 diabetes // *Semin. Immunol.* 2011, 23, N 3, 214-219.
 19. Denes B., Yu J., Fodor N. et al. Suppression of hyperglycemia in NOD mice after inoculation with recombinant vaccinia viruses // *Mol. Biotechnol.* 2006, 34, N 3, 317-327.
 20. Goudy K.S., Burkhardt B.R., Wasserfall C. et al. Systemic overexpression of IL-10 induces CD4+CD25+ cell populations in vivo and ameliorates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice in a dose-dependent fashion // *J. Immunol.* 2003, 171, N 5, 2270-2278.
 21. Lin M.S., Tse H.M., Delmastro M.M. et al. A multivalent vaccine for type 1 diabetes skews T cell subsets to Th2 phenotype in NOD mice // *Immunol. Res.* 2011, 50, N 2-3, 213-220.
 22. Duncan B., Nazarov-Stoica C., Surls J. et al. Double negative (CD3+ 4- 8-) TCR alphabeta splenic cells from young NOD mice provide long-lasting protection against type 1 diabetes // *PLoS One*. 2010, 5, N 7, e11427.
 23. Luo X., Yang H., Kim I.S. et al. Systemic transforming growth factor-beta1 gene therapy induces Foxp3+ regulatory cells, restores self-tolerance, and facilitates regeneration of beta cell function in overtly diabetic nonobese diabetic mice // *Transplantation*. 2005, 79, N 9, 1091-1096.
 24. Feili-Hariri M., Falkner D.H., Gambotto A. et al. Dendritic cells transduced to express interleukin-4 prevent diabetes in nonobese diabetic mice with advanced insulinitis // *Hum. Gene Ther.* 2003, 14, N 1, 13-23.
 25. Ruffner M.A., Robbins P.D. Dendritic cells transduced to express interleukin 4 reduce diabetes onset in both normoglycemic and prediabetic nonobese diabetic mice // *PLoS One*. 2010, 5, N 7, e11848.
 26. Peng J., Dicker B., Du W. et al. Converting antigen-specific diabetogenic CD4 and CD8 T cells to TGF-

beta producing non-pathogenic regulatory cells following FoxP3 transduction // *J. Autoimmun.* 2007, 28, N 4, 188-200.

27. Kornete M., Sgouroudis E., Piccirillo C.A. ICOS-dependent homeostasis and function of Foxp3+ regulatory T cells in islets of nonobese diabetic mice // *J. Immunol.* 2012, 188, N 3, 1064-1074.

СТАН І ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ ГЕННОЇ ТЕРАПІЇ В ЛІКУВАННІ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 1 ТИПУ

М.Д. Тронько, О.І. Ковзун

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

Резюме. В огляді представлено сучасні дані і перспективи застосування генної терапії в лікуванні цукрового діабету 1 типу, розглянуто методи доставки генів, проведено оцінку безпечності застосування генної терапії і біологічної активності таких засобів.

Ключові слова: цукровий діабет, стрептозотоциновий діабет, генна терапія, вектори доставки генів.

THE PRESENT AND PROSPECTS OF GENE THERAPY FOR TYPE 1 DIABETS

M.D. Tronko, O.I. Kovzun

State Institution «V. P.Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, Academy of Medical Sciences of Ukraine»,

Summary. The article presents the current recommendation and possible prospects for the use of gene therapy for type 1 diabetes treatment. The authors observed gene transfer methods, safety of gene therapy and biological activity of these options.

Keywords: diabetes mellitus, streptozotocyne diabetes, gene therapy, gene transfer vectors.