

## Rassegna

# Le cellule staminali nella terapia del diabete

V. Sordi<sup>1</sup>, L. Piemonti<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Unità della Biologia della Cellula Beta; <sup>2</sup>Unità di Chirurgia Sperimentale, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

Corrispondenza: dott. Lorenzo Piemonti, Istituto Scientifico San Raffaele, via Olgettina 60, 20132 Milano  
e-mail: piemonti.lorenzo@hsr.it

G It Diabetol Metab 2008;28:71-89

*Pervenuto in Redazione il 09-11-2007*

*Accettato per la pubblicazione il 21-01-2008*

Parole chiave: diabete, cellule staminali, proliferazione beta cellulare, terapia cellulare

Key words: diabetes, stem cell, beta cell proliferation, cell therapy

## RIASSUNTO

Il diabete di tipo 1 è caratterizzato dalla distruzione selettiva delle beta cellule causata da un attacco autoimmune. Il diabete di tipo 2 è una patologia più complessa che, oltre alla perdita di beta cellule dovuta ad apoptosi, comprende dedifferenziazione delle beta cellule e resistenza periferica all'insulina. In entrambi i tipi di diabete, la causa primaria dell'alterato controllo del livello di glucosio nel sangue e delle sue complicanze è il numero insufficiente di beta cellule che producono insulina. Il ripristino delle beta cellule danneggiate tramite trapianto da fonti esterne o tramite rigenerazione endogena del pancreas rappresenta una opzione terapeutica ideale. La guarigione dal diabete può essere raggiunta con il trapianto di isole pancreatiche e, da quando è stato sviluppato il protocollo di Edmonton, il trapianto di isole ha dato nuove speranze ai pazienti con diabete di tipo 1. Tuttavia, a causa della limitatezza del tessuto disponibile da donazione, trovare una fonte alternativa di tessuto insulare è diventato un campo di studi di sempre maggior rilevanza. Gli sforzi per raggiungere questo obiettivo sono rivolti in direzioni diverse. La possibilità di generare cellule secernenti insulina o isole con cellule staminali o progenitrici da pancreas adulto è stata ampiamente studiata. Una delle strategie della medicina rigenerativa nel campo del diabete, basata sul concetto che le beta cellule sono capaci di proliferare in maniera significativa durante la vita adulta, è la stimolazione della proliferazione di beta cellule *in vivo* e *in vitro*. Alternativamente, sono stati fatti tentativi di differenziare nella direzione della secrezione di insulina cellule mature come gli epatociti, sfruttando la conoscenza dei meccanismi molecolari legati all'espressione di fattori trascrizionali della beta cellula. Passi avanti sono stati compiuti anche nel dirigere la differenziazione delle cellule staminali embrionali. Sebbene i progressi fatti finora siano incoraggianti, molte lacune nella nostra comprensione dello sviluppo del pancreas e della beta cellula adulta sono da colmare prima che si giunga a una possibile applicazione terapeutica. Questo articolo mira a discutere i recenti progressi nello studio della cellula staminale o progenitrice del pancreas adulto e a suggerire future direzioni in questo campo.

## SUMMARY

### *Stem cell therapies for diabetes*

*Type 1 diabetes is characterized by the selective destruction of pancreatic beta-cells caused by an autoimmune attack. Type 2 diabetes is a more complex disease which, in addition to beta-cell loss caused by apoptotic programs, includes beta-cell de-differentiation and peripheral insulin resistance. In both type 1 and type 2 diabetes, insufficient numbers of insulin-producing beta cells are a major cause of defective control of blood glucose. Restoration of damaged beta-cells by transplantation from exogenous sources or by endocrine pancreas regeneration would be ideal therapeutic options. Reversal of diabetes can be achieved through islet transplantation and since the development of the Edmonton Islet Transplantation Protocol, islet transplantation has given new hope to patients with type 1 diabetes. However, due to the shortage of available donor tissue, finding an alternative source of islet tissue has become an increasingly important field of study. Efforts to achieve this goal explore several directions. The possibility of generating insulin-secreting cells and islet tissue with adult pancreatic stem or progenitor cells has been investigated extensively. Based on the realization that beta cells are capable of significant proliferation throughout adult life, the enhanced proliferation of beta cells in vivo or in vitro is pursued as a strategy for regenerative medicine for diabetes. Alternatively, the conversion of differentiated cells such as hepatocytes into beta cells is being attempted using molecular insights into the transcriptional makeup of beta cells. Advances were also made in directing the differentiation of embryonic stem cells into beta cells. Although progress is encouraging, major gaps in our understanding of developmental biology of the pancreas and adult beta-cell dynamics remain to be closed before a therapeutic application is made possible. This review aims to discuss recent progress in the study of adult pancreatic stem or progenitor cells and to suggest future directions in this field.*

## Diabete: perché abbiamo bisogno di nuovi approcci terapeutici

In tutte le sue forme, il diabete affligge almeno 200 milioni di persone nel mondo<sup>1</sup>, di cui circa il 10% sono pazienti con diabete mellito di tipo 1. Sia il diabete mellito di tipo 1 sia quello di tipo 2 hanno in comune un deficit della massa beta cellulare seppur principalmente derivato da due eventi eziopatogenetici differenti (risposta autoimmune e insulino-resistenza). Dati storici riportano una distruzione stimata tra il 67 e il 90% della massa beta cellulare originale<sup>2</sup> nel paziente con diabete di tipo 1 all'esordio e recentemente studi effettuati con clamp iperglicemico e stimolazione con glucagone hanno confermato un deficit del 75% rispetto ai controlli sani<sup>3</sup>. Analogamente anche nel diabete di tipo 2 è dimostrata l'esistenza di un deficit della massa beta cellulare che negli stadi tardivi può essere ridotta del 50% circa rispetto a un soggetto normale<sup>4</sup>. Nonostante i notevoli miglioramenti nella terapia insulinica legati alla disponibilità delle nuove preparazioni commerciali e l'adozione di regimi di trattamento intensivo in grado di migliorare il controllo glicemico, la sommini-

strazione esogena di insulina al momento non è in grado di evitare le complicanze di lungo periodo del diabete e l'attesa di vita del paziente diabetico rimane ridotta rispetto a quella della popolazione generale<sup>5,6</sup>. In linea di principio la cura per il diabete di tipo 1 e, per molti casi, anche di tipo 2, risiede nella possibilità di trovare un sostituto della massa beta cellulare che sia in grado di assolvere a due funzioni essenziali: misurare i livelli di glucosio nel sangue e secernere livelli appropriati di insulina. Un apparato tecnico meccanico (pancreas artificiale) in grado di svolgere questa funzione potrebbe offrire una soluzione soddisfacente, ma al momento questo approccio non ha ancora una prospettiva clinica a breve periodo<sup>7</sup>. Al momento l'unica terapia disponibile in clinica in grado di ricostruire il patrimonio beta cellulare del paziente diabetico è il trapianto allogenico/autologo di cellule beta (terapia cellulare somatica con trapianto di pancreas, isole di Langerhans o singole cellule beta). Nonostante i progressi degli ultimi anni<sup>8</sup>, la terapia somatica allogenica rimane problematica da molti punti di vista: tra questi, la necessità di una terapia immunosoppressiva, la necessità di ricorrere a molti donatori di isole per un singolo ricevente e la durata limitata nel tempo del trapianto funzionante. Ne consegue che strategie rivolte a ricostruire la massa beta cellulare a partire da cellule staminali o precursori utilizzando come sorgente cellule di derivazione pancreatica o extrapancreatica sono di assoluta rilevanza.

## La massa beta cellulare è statica o dinamica?

Il pancreas endocrino adulto è stato per lungo tempo considerato costituito da una popolazione di cellule quiescenti. Recenti studi hanno però dimostrato che, come molti altri tessuti, anche la massa beta cellulare è regolata in modo dinamico e la relazione tra i meccanismi di espansione e riduzione è in grado di determinare la massa finale<sup>9,10</sup>. È ormai largamente accettato che immediatamente dopo la nascita esista un incremento transiente della massa beta cellulare, sia nell'uomo, sia nell'animale<sup>11</sup>. Successivamente la massa beta cellulare aumenta in relazione all'aumentare del peso corporeo<sup>12,13</sup> fino al raggiungimento di una condizione di stabilità nella vita adulta. Durante la vita adulta esistono condizioni fisiopatologiche in grado di modulare la massa beta cellulare. Per esempio, l'obesità e l'insulino-resistenza determinano un incremento della massa beta cellulare, tanto nell'uomo<sup>4,14</sup> quanto nelle modellistiche animali<sup>15-19</sup>. La gravidanza ugualmente determina un incremento della massa beta cellulare di un fattore stimato di 2,5 volte<sup>20,21</sup>. Il post partum, viceversa, è un esempio di diminuzione della massa beta cellulare<sup>22,23</sup>, così come le condizioni di iperinsulinismo determinate da ipersecrezione di insulina da parte di insulinomi pancreatici<sup>24</sup>. A supporto della dinamicità della massa beta cellulare esistono poi numerosi modelli sperimentali nei roditori comprendenti la pancreasectomia parziale, la legatura del dotto di Wirsung e il *cellophane wrapping* del pancreas,

l'infusione di glucosio in acuto o in cronico, la somministrazione di agenti tossici per la cellula beta quali la streptozotocina durante il periodo neonatale, la somministrazione di potenziali fattori di crescita quali gastrina e GLP-1 o il suo equivalente farmacologico exenatide. Nei roditori la vita media di una cellula beta in condizioni fisiologiche è stata stimata essere di 60 giorni<sup>25</sup>. Se esiste un generale consenso sul fatto che la massa beta cellulare possa essere dinamica e non statica, non esiste al momento consenso sui meccanismi che regolano il turnover beta cellulare. L'espansione della massa beta cellulare può avvenire per aumento delle dimensioni (ipertrofia), per divisione mitotica di cellule beta differenziate (proliferazione) o per differenziazione a partire da precursori (neogenesi), mentre la riduzione può avvenire per riduzione delle dimensioni cellulari (atrofia), morte (prevalentemente per apoptosi) o perdita della stabilità fenotipica (dedifferenziazione). Il contributo dato da ciascuno dei meccanismi descritti nella determinazione della massa beta cellulare non è costante e può variare da specie a specie, in funzione dell'età e delle condizioni fisiopatologiche, o dei modelli utilizzati<sup>9,10</sup> (Tab. 1).

## Modulazione della massa beta cellulare: proliferazione meglio di differenziazione?

Recentemente, mediante l'utilizzo di esperimenti di *lineage tracing*, è stato possibile identificare nel topo il meccanismo che principalmente regola il turnover delle beta cellule nella vita postnatale. La stragrande maggioranza delle beta cellule deriva infatti da beta cellule preesistenti, dimostrando che la proliferazione, più che la differenziazione, è il meccanismo principalmente coinvolto nella formazione di nuove cellule beta<sup>26-29</sup>. A supporto ulteriore di questa conclusione è l'evidenza che l'arresto forzato del ciclo cellulare delle cellule beta riduce drammaticamente la massa beta cellulare postnatale (e non quella embrionale) e di conseguenza che la presenza di eventuali precursori non è in grado di compensare e mantenere la massa beta cellulare in assenza di una proliferazione delle cellule beta<sup>30-32</sup>. Il suggerimento derivante da questi studi è quindi che le cellule beta differenziate mantengono una significativa capacità proliferativa e che questa rappresenta il target terapeutico ideale per la ricosti-

**Tabella 1** Meccanismi coinvolti nella modulazione della massa beta cellulare in condizioni fisiopatologiche e in modelli sperimentali.

	Dimensione	Proliferazione	Neogenesi	Apoptosi
<b>Vita postnatale</b>				
Neonatale	=	↑↑	↑↑	↑
Adulta	↑	↑	No	↑/↓
Avanzata	↑↑	↑/=	No	↑/↓
<b>Obesità/insulino-resistenza</b>	↑	↑↑	No	(?)
<b>Gravidanza</b>	↑↑	↑↑	No	↓
<b>Post partum</b>	↓	↓	No	↑↑
<b>Insulinoma</b>	↓	↓	No	↑↑
<b>Infusione di glucosio</b>				
Acuta	↑/=	↑/=	↑↑↑	↓
Cronica	↑↑	↑↑	↑	↑
<b>Legatura del dotto e cellophane wrapping</b>	=	↑↑	↑↑	NV
<b>Pancreasectomia</b>				
70%	=	↑↑	No	NV
90%	=	↑	↑↑	NV
<b>Streptozotocina neonatale</b>	=	↑	↓	NV
<b>Exendin-4</b>	=	↑↑	↑↑	↓
<b>Gastrina</b>	=	= (?)	↑↑	↓

NV: non valutato; =: invariato; ↓: diminuito; ↑: aumentato.

tuzione del patrimonio beta cellulare. Come tutte le cellule somatiche, anche le cellule beta regolano la proliferazione con l'entrata e la progressione nel ciclo cellulare. La conoscenza della regolazione del ciclo cellulare delle beta cellule è quindi un passo fondamentale per poter intraprendere strategie volte a incrementare la massa beta cellulare nell'adulto. Nel modello murino è stato possibile dimostrare che molecole regolatorie della fase G1/S (come per esempio *D cyclins*, *cdk-4*, *p18*, *p21*, *p27*) sono critiche per la proliferazione e che, come regola generale, le cellule beta appaiono cellule a lenta proliferazione in cui sono espresse tutte le proteine inibitrici del ciclo cellulare cercate. In conseguenza di questo, la perdita di un solo *brake* del ciclo cellulare (*p18*, *p27*, *p21*, *pRb*, *p53*) non determina generalmente la proliferazione, mentre questo si osserva in seguito a perdita di più *brake* (*p18* plus *p27*, *pRb* plus *p53*).

Se è vero che nel modello murino le beta cellule sono in grado di andare incontro a un turnover elevato e nei modelli sperimentali a una capacità adattativa espansiva notevole, altrettanto vero è che questa capacità nell'uomo deve ancora essere dimostrata. Per esempio nel modello murino la massa beta cellulare è in grado di aumentare di 10 volte per ipertrofia e proliferazione in risposta all'insulino-resistenza determinata dall'obesità<sup>33</sup>. Nell'uomo l'obesità è in grado di determinare un incremento solo del 50% della massa beta cellulare, principalmente dovuta a un incremento modesto della dimensione delle isole e con evidenze di un incremento marginale dei marker di proliferazione<sup>4</sup>. Più in generale, la doppia colorazione per Ki-67 e insulina nel pancreas adulto umano mostra la presenza di 0,05 beta cellule positive per isola<sup>4</sup>, mentre la corrispondente frequenza in un topo adulto (1 anno) è almeno 10 volte più grande in animali magri (0,5 cellule per isola) e ancora di più in animali obesi<sup>33</sup>. Nel roditore l'esecuzione di una pancreatectomia del 90% determina un diabete transitorio e la massa beta cellulare rigenera velocemente in due settimane<sup>34-36</sup>. Nell'uomo una pancreatectomia del 50% non è caratterizzata da eventi di rigenerazione o proliferazione beta cellulare<sup>37</sup> e determina insorgenza di diabete nei soggetti che aumentano di peso<sup>38</sup>. Analogamente a quanto osservato nell'uomo, nel cane adulto una pancreatectomia del 50% comporta alterazione del metabolismo del glucosio nel breve periodo<sup>39</sup> e diabete nel lungo periodo<sup>40</sup>. Se dunque non vi sono dubbi che la replicazione delle cellule beta rappresenti un'importante risorsa di beta cellule nel piccolo animale, è molto meno chiaro quale sia il reale peso della duplicazione nel mantenere la massa beta cellulare di un pancreas adulto umano.

Indipendentemente dalla capacità "naturale" delle beta cellule del pancreas umano di duplicare, anche la possibilità di indurre forzatamente (farmacologicamente) la loro proliferazione è potenzialmente limitata da alcuni aspetti: innanzitutto la necessità di individuare *pathway* regolatori della proliferazione specifici della beta cellula per evitare uno stimolo proliferativo generalizzato predisponente allo sviluppo di neoplasie; secondariamente, al momento non siamo in grado di comprendere esattamente la conseguenza di una forzata duplicazione delle cellule beta. Infatti, una inappropriata proliferazione, accanto allo sviluppo potenziale di neo-

plasie endocrine, potrebbe attivare anche controprocessi soppressivi in grado di spingere le cellule beta "inappropriatamente" proliferanti verso stadi terminali quale la morte per apoptosi o forme di arresto irreversibile del ciclo cellulare quali la senescenza<sup>41</sup>. Come regola generale, l'espansione delle beta cellule umane *in vitro* è risultata fino a ora estremamente difficoltosa, in genere quantitativamente irrilevante a scopi terapeutici, e caratterizzata da un processo di dedifferenziazione con perdita della capacità di produzione e secrezione dell'insulina<sup>42</sup>.

Comunque sia, nell'ambito della terapia del diabete mellito, un certo numero di terapie finalizzate alla formazione di cellule beta per proliferazione o inibizione della morte per apoptosi sono in corso di valutazione, in alcuni casi anche con studi clinici. Effetti proliferativi sulle cellule beta sono stati riportati per numerosi ormoni di origine gastrointestinale (per esempio GLP1, GLP2, gastrina, bombesina, colecistochinina), tutti accomunati dal fatto di agire su recettori a sette domini transmembrana in grado di determinare un incremento dell'AMP ciclico. Un ruolo potenziale della gastrina nel ricostruire la massa beta cellulare è stato proposto nel 2005 sulla base di esperimenti nel topo NOD<sup>43</sup> e sull'evidenza di un'aumentata proliferazione delle cellule beta nelle isole umane di pazienti affetti da gastrinoma<sup>44</sup>. Tuttavia il potenziale terapeutico della gastrina è limitato dagli effetti "collaterali" a carico del sistema gastrointestinale (diarrea, ulcera peptica). Clinicamente più promettente è la possibilità di utilizzare analoghi di GLP1 o inibitori della dipeptidil peptidasi IV che hanno mostrato in modelli murini la capacità di aumentare la massa beta cellulare<sup>45</sup>, ma l'evidenza che questo possa avvenire anche nell'uomo al momento è mancante. L'induzione della proliferazione delle cellule beta è stata riportata anche in risposta a fattori di crescita quali l'ormone della crescita (GH, *growth hormone*), il fattore di crescita insulino-simile (*insulin like growth factor-1*), il fattore di crescita epiteliale (EGF, *epithelial growth factor*), il fattore di crescita degli epatociti (HGF, *hepatocyte growth factor*) e il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF, *fibroblast growth factor*) ma, diversamente dalle incretine, questi fattori di crescita non agiscono in modo specifico sulle beta cellule e quindi possono causare effetti sistemici con elevato rischio di indurre neoplasie. Recentemente un'azione diretta sul turnover della massa beta cellulare è stata ipotizzata per alcuni farmaci già clinicamente utilizzati. Metformina ha mostrato, per esempio, la capacità *in vitro* di inibire l'apoptosi delle cellule beta umane<sup>46</sup>, ma quale ruolo questo meccanismo giochi nella preservazione della massa beta cellulare osservato nel trattamento con metformina nei diversi studi clinici è al momento sconosciuto<sup>47,48</sup>. La preservazione della funzione beta cellulare nelle donne con diabete gestazionale trattate con troglitazone ha recentemente portato a speculare un ruolo benefico dei glitazonici sulla massa beta cellulare<sup>49</sup>. Successivi esperimenti *in vitro* su linee beta cellulari o isole umane hanno mostrato un'inibizione dell'apoptosi delle beta cellule da parte dei glitazonici associata all'attivazione del *pathway* PI3K/AKT<sup>50</sup>. Questo meccanismo potrebbe spiegare la relativa lenta velocità di deterioramento delle cellule beta osservata nei pazienti diabetici di tipo 2 trattati in

monoterapia con rosiglitazone<sup>48</sup>. L'uso dei glitazonici come strategia di prevenzione del diabete (agendo sul turnover della massa beta cellulare) deve però essere bilanciato con la crescente evidenza degli effetti collaterali di questa classe di composti comprendenti scompenso cardiaco, perdita di massa ossea e infarto miocardico<sup>51</sup>. Infine, dato che in alcuni trial eseguiti per valutare gli effetti cardiovascolari degli ACE-inibitori si è evidenziata una riduzione dell'incidenza del diabete mellito di tipo 2, è stato ipotizzato anche un ruolo di questa classe di farmaci sul turnover della massa beta cellulare. Studi *in vitro* su isole umane hanno effettivamente suggerito una riduzione dell'apoptosi beta cellulare in presenza di ACE-inibitori, riduzione correlata alla riduzione dello stress ossidativo<sup>52</sup>. La capacità degli ACE-inibitori di prevenire il diabete mellito non è stata però confermata in recenti trial con ramipril in pazienti con ridotta tolleranza al glucosio<sup>53</sup>, per cui al momento qualsiasi ipotesi di un'azione degli ACE-inibitori *in vivo* sulla massa beta cellulare rimane discutibile. Un'azione sfavorevole sul turnover beta cellulare è stata invece suggerita per le sulfoniluree in quanto in grado di determinare *in vitro* un incremento dell'apoptosi in isole umane<sup>54</sup>. Anche in questo caso rimane da chiarire quanto questo meccanismo giochi un ruolo chiave per spiegare l'osservazione clinica del rapido declino della funzione beta cellulare e del precoce fallimento del trattamento nei pazienti trattati con sulfonilurea<sup>55</sup>.

Nel campo della proliferazione delle cellule beta si deve infine segnalare anche un approccio di terapia genica volto all'inserimento reversibile di geni in grado di immortalizzare le cellule beta. Narushima<sup>56</sup>, tramite l'inserzione e successiva rimozione di due geni immortalizzanti (SV40T e hTERT), è riuscito a immortalizzare in modo reversibile le cellule beta umane. In termini di secrezione insulinica tali cellule rispondono come cellule beta normali, anche se con una potenza minore (30-40% di contenuto insulinico). Nel modello animale le stesse cellule sono risultate in grado di mantenere la condizione di normoglicemia per tempistiche superiori ai 7 mesi. In un'ottica di utilizzo clinico, oltre alla problematica di utilizzare cellule massicciamente manipolate con geni potenzialmente rilevanti per l'oncogenesi, bisogna sottolineare che il processo di ingegnerizzazione è risultato altamente inefficiente (solo 1 su 253 linee risultata idonea) e, considerando che per normalizzare la glicemia nel topo sono stati necessari 3 milioni di cellule, si deve stimare, per curare il diabete nell'uomo, una numerosità di  $1 \times 10^{12}$  cellule, quantità che *in vitro* richiede numerose espansioni con alta probabilità di induzione di mutazioni.

## Differenziazione di cellule beta: criteri per definire una cellula staminale o un precursore della beta cellula

Per poter affermare di aver identificato un precursore o una cellula staminale in grado di differenziare in cellula beta è necessario rispettare criteri metodologici rigorosi onde evi-

tare potenziali errori interpretativi abbondantemente accaduti in passato. È opinione condivisa che la cellula staminale o progenitrice candidata debba rispettare i seguenti criteri: 1) la cellula staminale o progenitrice deve essere isolata per clonaggio o per espressione di marker specifici, mentre parlare di una popolazione originale arricchita in precursori o staminali non è sufficiente; 2) la differenziazione *in vitro* in una beta cellula deve essere inequivocabilmente dimostrata. L'espressione di insulina di per sé non è sufficiente a definire una cellula come una beta cellula e l'espressione di altri marker è necessaria (Pdx1/ipf1, glut2, glucocinasi ecc.); 3) studi ultrastrutturali devono essere in grado di confermare la presenza di granuli maturi di secrezione; 4) la funzione *in vitro* delle cellule endocrine differenziate deve essere simile a quella della controparte naturale, che per le cellule beta significa una secrezione insulinica adeguata in risposta al glucosio, agli ormoni incretinici e ai secretagoghi con proprietà elettrofisiologiche adeguate; 5) la funzione deve essere dimostrata *in vivo* in animali diabetici dove le cellule endocrine devono essere in grado di mantenere in maniera riproducibile e duratura il controllo glicemico con la contro-dimostrazione che la loro rimozione determini la ricomparsa del diabete. Attualmente sussistono significative controversie sui risultati ottenuti nell'area della differenziazione beta cellulare e, se si rispettano i criteri sopraelencati, nessuna cellula staminale adulta in grado di dar vita a una beta cellula nell'uomo è stata caratterizzata. Molti candidati sono stati identificati, isolati e parzialmente caratterizzati, ma i protocolli di differenziazione fino a ora proposti hanno permesso di ottenere cellule con capacità secretoria dell'insulina estremamente ridotta rispetto a quella di una cellula beta.

## Differenziazione di cellule beta: cosa ci insegna l'embriogenesi pancreatica?

Uno degli assunti della ricerca nel campo della differenziazione beta cellulare è che le cellule progenitrici nell'ontogenesi insulare e la rigenerazione delle isole dopo la nascita abbiano meccanismi strettamente correlati se non addirittura identici. Dallo studio della organogenesi pancreatica è quindi possibile trarre due importanti insegnamenti per la differenziazione delle cellule beta:

- 1) durante lo sviluppo del pancreas numerosi fattori di trascrizione sono espressi in modo sequenziale e questo permette di poter utilizzare gli stessi per identificare cellule staminali/progenitrici con potenziale differente. Attraverso esperimenti di *lineage tracing* si è dimostrato che le cellule progenitrici esprimenti *Pdx1/Ptf1a* nel pancreas embrionale sono in grado di dar vita a tutte le tipologie cellulari pancreatiche. Una sottopopolazione di queste cellule destinate a dare origine al pancreas endocrino esprime in modo transiente il gene per la neurogenina 3 (*Ngn3*) e le cellule *Ngn3*<sup>+</sup> sono in grado di differenziare in tutte le cellule endocrine dell'isola incluse le cellule beta<sup>57</sup>. Gli studi effettuati utilizzando

modelli murini di *knocking out* di geni candidati (Tab. 2) ha permesso una dettagliata conoscenza del processo di differenziazione del pancreas endocrino in termini di espressione di fattori di trascrizione<sup>58</sup> permettendo di ricostruire nel roditore una gerarchia temporale e funzionale molto chiara (Fig. 1). La conferma della rilevanza anche nell'uomo dei fattori trascrizionali coinvolti nello sviluppo pancreatico ci viene fornita indirettamente dalla progressiva caratterizzazione molecolare del MODY (*maturity onset diabetes of the young*). Il MODY è una forma di diabete non autoimmune a trasmissione autosomica dominante con elevata penetranza, causata da una mutazione puntiforme o da una delezione di geni. Sono attualmente classificate 6 forme di MODY e, a eccezione del MODY 2 che è associato a un difetto della glucochinasi<sup>59</sup>, le altre 5 mutazioni riguardano fattori di trascrizione. La mutazione in omozigosi di *Pdx1/Ptf1a* determina l'agenesia del pancreas mentre la sua mutazione in eterozigoti determina il MODY 4<sup>60</sup>. Analogamente le mutazioni di *hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$* , -1 $\alpha$ , -1 $\beta$  (HNF-4 $\alpha$ , -1 $\alpha$ , -1 $\beta$ ) e *neuroD1* determinano rispettivamente il MODY 1, 3, 5 e 6<sup>61-64</sup>.

- II) Il pancreas deriva dall'endoderma embrionale<sup>58</sup> ma numerosi fattori solubili prodotti dagli altri foglietti germinali sono rilevanti per lo sviluppo. In particolare l'interazione epitelio-mesenchimale risulta di particolare rilevanza<sup>65</sup> ed è ormai chiaro che segnali derivanti dal mesenchima, ancorché non istruttivi, siano comunque permissivi per lo sviluppo del pancreas. Tra questi sono stati

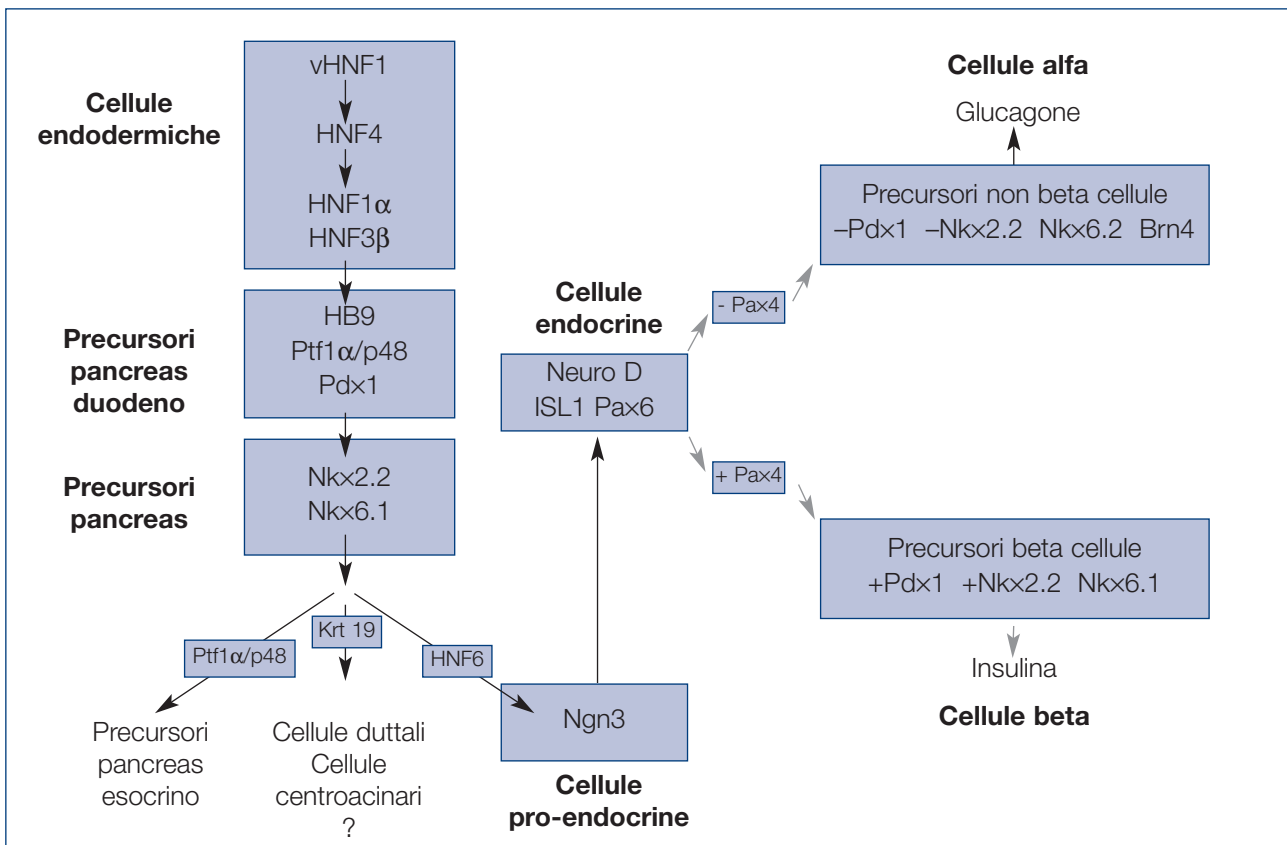
caratterizzati numerosi fattori solubili quali i membri della famiglia dell'EGF, del FGF e vari altri fattori di crescita (fattore di crescita insulino-simile; TGF $\alpha$ , *transforming growth factor  $\alpha$* ; TGF $\beta$ , *transforming growth factor  $\beta$* ; HGF; NGF, *neural growth factor*; VEGF, *vascular endothelial growth factor*; gastrina). Molti di questi fattori sono stati utilizzati nei protocolli di differenziazione beta cellulare.

## Differenziazione di cellule beta a partire da cellule staminali/progenitrici pancreatiche

Se esista una cellula pancreatica adulta progenitrice o staminale in grado di differenziare in beta cellula è motivo di discussione e sono state utilizzate strategie differenti per la sua eventuale identificazione e isolamento. Seaberg<sup>66</sup> ha suggerito l'esistenza di una cellula staminale pluripotente presente a bassa frequenza (0,02-0,03%) nel pancreas murino capace di differenziarsi in cellule neuronali, cellule endocrine e proto-beta cellule. Utilizzando una strategia di coltura oligoclonale a partire da pancreas adulto di topo in presenza di FGF2 e EGF ha ottenuto lo sviluppo di colonie monoclonali (2000-10.000 cellule) esprimenti marcatori beta cellulari a livello di mRNA (insulina, glucochinasi, glut2, Pax6, Beta2/neuroD, Hlxb9, Isl-1, Nkx2.2, Nkx6.1 e PDX-1) e a

**Tabella 2** Fattori di trascrizione coinvolti nello sviluppo pancreatico.

Fattore di trascrizione	Espressione nel pancreas adulto	Fenotipo in topo KO
HNF-3 $\beta$	Tutte le cellule	No intestino anteriore (morte embrionale E11)
HNF-3 $\alpha$	Cellule endocrine	Normale numero cellule $\alpha$ ma riduzione 70% mRNA per glucagone
Hlxb9	Cellule $\beta$	Agenesia pancreas dorsale, riduzione cellule $\beta$ in ventrale
PDX-1/IPF-1	Cellule $\beta$	Agenesia pancreas
HNF6	Tutte le cellule	Riduzione cellule endocrine alla nascita con architettura insulare perturbata
PBX1	Cellule $\beta$	Ipolasia pancreatica, difetti marcati dell'esocrino
PTF1 $\alpha$ -p48	Acinare	Agenesia pancreas esocrino con allocazione errata dell'endocrino
Pax4	Bassa nelle isole	No cellule $\beta$ e $\delta$ , aumento cellule $\alpha$
Pax6	Cellule endocrine	No cellule $\alpha$
Isl-1	Isole	Agenesia mesoderma del pancreas dorsale e delle isole
Nkx2.2	Cellule $\alpha$ , $\beta$ , PP	No cellule $\beta$ mature, diminuzione $\alpha$ e PP
Nkx6.1	Cellule $\beta$	Diminuzione cellule $\beta$
Ngn3	Non espresso	Assenza cellule endocrine, polarità acinare perturbata
$\beta$ 2/neuroD	Isole	Diminuzione di tutte le cellule endocrine
Mist1	Cellule acinari	Disorganizzazione del tessuto acinare
HNF-1 $\alpha$	Cellule $\beta$	Deficit secrezione insulinica stimolata dal glucosio



**Figura 1** Gerarchia e tempistica di espressione dei fattori trascrizionali coinvolti nello sviluppo embrionale del pancreas.

livello proteico (insulina, C-peptide e PDX-1). Queste cellule sono risultate in grado di incrementare le concentrazioni intracellulari di calcio e di rilasciare insulina quando stimolate con elevate concentrazioni di glucosio. L'identità della cellula originale in grado di dar vita alle colonie però non è stata caratterizzata e il contributo di queste cellule alla dinamicità della massa beta cellulare rimane sconosciuto così come la loro funzione *in vivo*. Sempre nel modello murino, utilizzando un approccio di purificazione per citometria a flusso e successiva analisi clonale, Suzuki<sup>67</sup> ha proposto le cellule positive per c-met (il recettore di HGF) come cellule staminali/progenitrici che costituirebbero circa l'1% delle cellule pancreatiche e sarebbero distribuite a livello sia del dotto sia del tessuto acinare. Più recentemente Hao<sup>68</sup> ha suggerito l'esistenza nel compartimento non endocrino del pancreas umano di cellule epiteliali in grado di dar vita a cellule produttrici di insulina *in vivo* quando cotrapiantate con cellule pancreatiche fetali. Anche in questo caso l'identità della cellula originale non è stata caratterizzata né è stata provata la sua esistenza nel pancreas nativo, potendo quindi il tutto essere frutto della manipolazione *in vitro*.

Sulla base delle analisi dei modelli di rigenerazione pancreatica nei roditori è ragionevole pensare che la cellula staminale pancreatica, se esiste, risieda a livello dei dotti del pancreas. Per questa ragione diversi gruppi hanno utilizzato pre-

parazioni pancreatiche arricchite per cellule duttali come materiale iniziale per generare nuove isole pancreatiche. Sebbene siano stati riportati alcuni successi<sup>69-72</sup>, i dati pubblicati richiedono una revisione critica. Ramina<sup>69</sup>, partendo da cellule epiteliali duttali pancreatiche isolate manualmente da topi NOD prediabete, ha riportato la possibilità di generare nuove isole pancreatiche con una potenzialità di espansione di circa 10.000 volte utilizzando EGF, HGF e nicotina. Le neo-isole trapiantate sotto la capsula renale sono state descritte essere in grado di normalizzare la glicemia in modelli di diabete nel topo. Gli esperimenti *in vivo* sono però passibili di critica poiché, oltre a un problema di numerosità, gli autori non hanno mostrato se, una volta asportato il trapianto, il ricevente sviluppasse nuovamente diabete, non dimostrando così inequivocabilmente che il controllo glicemico dipendeva dalle neo-isole impiantate. Questo tipo di conferma risulta ancora più necessario se si considera che il contenuto insulinico riportato per le neo-isole era estremamente basso (0,5 pg) rispetto a quello di un'isola normale di topo (20-50 ng) e di conseguenza il contenuto insulinico trapiantato con le neo-isole non superava i 140-150 pg, quando, per ottenere la normoglicemia con isole normali, il contenuto insulinico minimo è superiore a 1,5  $\mu$ g. Bonner-Weir<sup>70</sup> ha riportato la possibilità di ottenere neo-isole da colture arricchite in cellule epiteliali di dotto nel topo, ma anche in

questo caso la produzione di cellule endocrine non sembra molto efficiente, non viene riportato il contenuto insulinico e non sono stati fatti esperimenti nel topo diabetico per mostrare l'efficienza *in vivo*. Non è inoltre da escludere che, nonostante la purificazione, cellule insulari contaminanti legate ai dotti vadano incontro a proliferazione giustificando parte dei risultati ottenuti. Un esempio di strategia alternativa per produrre beta cellule a partire dal dotto pancreatico è stata riportata da Heremans attraverso l'induzione dell'espressione di Ngn3 o neuroD/beta 2 in dotti umani utilizzando l'infezione con adenovirus<sup>73</sup>. Questo tipo di approccio dimostra che effettivamente un fenotipo neuroendocrino può essere ottenuto a partire da cellule duttali, ma il contenuto insulinico ottenuto è risultato basso, con una secrezione non modulata dal glucosio. Lo sforzo attuale nel dimostrare la possibilità dell'esistenza di neogenesi insulare a partire dal dotto è legata allo sviluppo di metodiche per ottenere preparazioni pure di dotti<sup>71</sup> o topi transgenici per *lineage tracing*<sup>74</sup> duttale. Cellule staminali/progenitrici pancreatiche sono state ipotizzate anche all'interno della componente acinare<sup>75-77</sup>, ma recenti esperimenti di *lineage tracing* acinare-specifico hanno escluso la possibilità di un contributo diretto delle cellule acinari alla massa beta cellulare<sup>78</sup>.

## Cellule staminali/progenitrici pancreatiche: cellule nestina positive e transizione epitelio mesenchimale, due promesse mancate?

La possibilità di identificare le cellule staminali/progenitrici del pancreas attraverso l'espressione del filamento intermedio nestina, un marker della cellula staminale neuronale, è stata suggerita nel recente passato. Zulewski<sup>79</sup> e Abraham<sup>80</sup> hanno infatti riportato che cellule esprimenti nestina possono essere isolate ed espanse *in vitro* dalle isole pancreatiche (sia umane sia di roditori). Nella stessa direzione differenti studi hanno supportato questa ipotesi<sup>66,81,82</sup>. *In vitro* è stato suggerito che le cellule positive per nestina possono andare incontro ai primi stadi di differenziazione beta cellulare e che le colture a lungo termine possano essere una sorgente di precursori per le beta cellule<sup>83,84</sup>. *In vivo*, utilizzando un modello di topo transgenico EGFP/nestina, Bernardo ha mostrato<sup>85</sup> l'espressione di marker sia del pancreas esocrino sia di quello endocrino nelle cellule positive per nestina. A fronte di queste evidenze, numerosi recenti lavori hanno contestato la positività per nestina come marker di precursore beta cellulare. Una dettagliata analisi dei primi stadi dello sviluppo del pancreas umano ha dimostrato che i precursori endocrini non esprimono nestina<sup>86</sup>. Inoltre, è stato riportato che l'espressione di nestina nelle cellule pancreatiche è limitata alla componente endoteliale dei vasi<sup>87,88</sup>. Infine, esperimenti di *lineage tracing* nel topo<sup>89-91</sup> e nell'uomo<sup>92</sup> hanno dimostrato in modo conclusivo che la componente positiva per nestina contribuisce alla formazione della microvascolatura, ma non alla componente endocrina delle isole.

Numerosi autori hanno riportato la possibilità di ottenere cellule di tipo mesenchimale da colture di tessuto endocrino o esocrino umano<sup>82,93-99</sup>. Anche se un'approfondita analisi di queste cellule non è ancora stata riportata, si è ipotizzato che questa componente derivi dalla transizione epitelio-mesenchimale (EMT, *epithelial-to-mesenchymal transition*) delle cellule beta<sup>82,93-96,98</sup>. In accordo con questo modello, la EMT è caratterizzata da una drastica riduzione dell'espressione di insulina nelle beta cellule accompagnata a una trasformazione delle stesse in una popolazione di progenitori mesenchimali ad alta capacità differenziativa che possono essere generati in quantità virtualmente illimitate. Diversi gruppi hanno riportato vari gradi di successo nella espansione e seguente ridifferenziazione delle cellule mesenchimali in beta cellule *in vitro*, e in almeno uno studio<sup>96</sup> un'espansione fino a 10<sup>12</sup> volte è stata ottenuta in assenza di fattori di crescita esogeni. Su questa base diversi ricercatori hanno ipotizzato per il futuro la possibilità, attraverso l'induzione di una efficiente ridifferenziazione in beta cellule, di utilizzare le cellule mesenchimali per la terapia del diabete<sup>100</sup>. La completa affermazione dell'ipotesi della EMT richiede però la dimostrazione conclusiva che le beta cellule e non altri tipi di cellule già presenti nelle isole danno vita ai precursori mesenchimali. Recentemente differenti gruppi attraverso esperimenti di *lineage tracing* hanno riportato evidenze conclusive nel topo contro l'esistenza del fenomeno di EMT delle cellule beta, dimostrando che la popolazione di cellule mesenchimali ottenute dal pancreas non derivano dalla differenziazione delle beta cellule<sup>101-104</sup>. Al momento, a dispetto di queste evidenze, l'esistenza di una EMT non può essere esclusa a priori nell'uomo e l'origine dei precursori mesenchimali non è ancora stata chiarita.

## Differenziazione di cellule beta a partire da cellule staminali/progenitrici non pancreatiche: precursori endodermici (fegato e intestino)

Le cellule beta condividono l'origine endodermica con il fegato e l'intestino<sup>105,106</sup> e la comune origine embrionale rende ovviamente potenzialmente più semplice la cross differenziazione tra questi organi, come è facilmente osservabile in fenomeni di transdifferenziazione spontanea del pancreas in fegato in alcune condizioni patologiche<sup>107-109</sup>. Similmente per l'intestino, l'analisi nei topi con delezione del fattore di trascrizione ptf1a mostra che le cellule originariamente destinate a diventare pancreas acquisiscono una caratterizzazione intestinale. Sulla base di questo background molti gruppi hanno testato la possibilità di transdifferenziare cellule epatiche o intestinali in cellule beta<sup>110</sup>. L'espressione ectopica dei geni pancreatici quali Pdx-1 o neuroD è stata in grado di indurre un programma di espressione genica pancreatica negli epatociti includendo l'espressione di insulina<sup>111-117</sup> e alcuni studi hanno mostrato effettivamente la possibilità di una transdifferenziazione dal fegato a

pancreas partendo da cellule epatiche umane sia adulte sia fetali<sup>118,119</sup>. Cellule epatiche fetali trasdotte con la telomerasi umana (hTERT) e successivamente con pdx-1, sono in grado di differenziare in cellule con capacità di produzione, stoccaggio e secrezione di insulina<sup>112</sup>. La secrezione insulinica appare regolata e le cellule ottenute sono in grado di raggiungere e mantenere la normoglicemia per periodi prolungati nel topo diabetico immunodeficiente. Risultati altrettanto promettenti sono stati ottenuti partendo da epatociti umani adulti in cui la sovraespressione di Pdx-1 e l'utilizzo di alcuni fattori differenziativi (activina-A, nicotinamide, HGF) permette una completa transdifferenziazione in cellule secernenti insulina in grado di normalizzare la glicemia nel topo diabetico immunodeficiente<sup>118</sup>.

Per ottenere cellule secernenti insulina a partire dal fegato e dall'intestino sono stati suggeriti anche approcci non legati alla transdifferenziazione per espressione di fattori di trascrizione, come per esempio la differenziazione di cellule beta a partire da *oval stem cell* epatiche e la possibilità di ingegnerizzare le cellule K dell'intestino con il gene dell'insulina. Yang<sup>117</sup> ha riportato che una popolazione altamente purificata di *oval stem cell* ottenuta dal fegato è in grado di transdifferenziare in presenza di un microambiente caratterizzato da alti livelli di glucosio. Le cellule ottenute sono in grado di costruire strutture simili alle isole, con l'espressione dei marker di differenziazione pancreatica e la capacità di normalizzare la glicemia *in vivo* nel topo. Kiefer<sup>120</sup>, supportato dall'evidenza che le cellule K dell'intestino possiedono caratteristiche chiave delle cellule endocrine, ha ingegnerizzato le stesse a produrre e secernere insulina con modalità glucosio-dipendente, generando così delle beta cellule funzionali. Ovviamente lo sviluppo di vettori robusti e sicuri per la terapia genica delle cellule K e/o delle cellule epatiche potrà aprire orizzonti clinici per queste strategie.

## Differenziazione di cellule beta a partire da cellule staminali/progenitrici non pancreatiche: precursori mesodermici (midollo osseo, cordone ombelicale)

La possibilità di ottenere cellule produttrici di insulina a partire da precursori mesodermici (midollo osseo e cellule circolanti del sangue) appare particolarmente attraente per la facilità di recupero del materiale e la possibilità di utilizzo di una sorgente autologa.

*In vitro* si è dimostrato in differenti modelli (topo, ratto e uomo) che cellule di derivazione dal midollo osseo, in particolare cellule staminali mesenchimali, sono in grado di differenziare in cellule produttrici di insulina e in qualche caso di correggere il diabete in modelli animali<sup>121-125</sup>. In modo simile, cellule staminali mesenchimali derivate da tessuto adiposo<sup>126</sup> e sottopopolazioni di monociti derivati dal sangue circolante<sup>127,128</sup> hanno mostrato capacità di espressione di insulina. In genere i livelli di espressione insulinica riportati in questi modelli sono risultati bassi.

*In vivo*, gli studi volti a valutare il contributo del midollo osseo nella rigenerazione pancreatica riportano risultati contraddittori. Ianus<sup>129</sup> ha riportato che il midollo osseo contiene cellule che hanno la capacità di differenziare in cellule beta competenti *in vivo* dimostrando che l'1,7-3% delle beta cellule del pancreas sono di origine midollare dopo 4-6 settimane da un trapianto di midollo nel topo. Gli stessi dati non sono stati confermati da altri gruppi e successivi studi hanno riportato frequenze molto più basse (0,004%) o addirittura l'assenza totale di fenomeni di rigenerazione beta cellulare di origine midollare<sup>130-132</sup>. Inoltre, più in generale, l'evidenza che la fusione cellulare piuttosto che la differenziazione sia alla base di numerosi processi di apparente differenziazione del midollo osseo in tessuti ectodermici o endodermici rende ancora più controversi gli studi compiuti<sup>133,134</sup>.

Recentemente il potenziale ruolo del midollo osseo nella rigenerazione delle beta cellule è stato rivalutato in un'ottica differente. Se infatti la differenziazione diretta risulta altamente improbabile<sup>135</sup>, numerose evidenze sperimentali suggeriscono che cellule di derivazione midollare siano in grado di favorire la rigenerazione endogena delle beta cellule<sup>133,136-140</sup>, probabilmente attraverso la differenziazione di precursori endoteliali e l'induzione del *pathway* c-Met/HGF<sup>141</sup>. A supporto di questi risultati recentemente è stato dimostrato che l'infusione di cellule staminali mesenchimali in topi NOD/Scid dopo distruzione delle isole mediante l'utilizzo di streptozotocina è in grado di aumentare il numero di beta cellule endogene con consecutivo miglioramento dell'iperglicemia<sup>142</sup>.

Accanto al midollo osseo, alcuni studi hanno riportato la possibilità di utilizzare come sorgente di cellule staminali nella terapia del diabete il cordone ombelicale. L'esistenza di cellule staminali mesenchimali o con caratteristiche embrionali nel sangue del cordone ombelicale è stata riportata<sup>143-144</sup> e alcuni lavori hanno descritto la possibilità di differenziare cellule che esprimono marker caratteristici della cellula endocrina (Isl-1, PDX-1, Pax-4 e Ngn3)<sup>145</sup> o addirittura produttrici di insulina a partire dal cordone ombelicale<sup>146-148</sup>. In modelli murini di diabete di tipo 1 e 2 le cellule mesenchimali derivanti dal cordone ombelicale si sono mostrate capaci di influenzare la sopravvivenza delle beta cellule e il controllo glicemico<sup>149,150</sup>.

I dati sperimentali *in vitro* e *in vivo*, associati alla facile reperibilità delle cellule staminali midollari e del cordone ombelicale e all'esperienza clinica già diffusamente acquisita nel campo ematologico, hanno permesso di iniziare alcuni studi clinici nell'uomo. Voltarelli<sup>151</sup> (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00315614) ha riportato uno studio clinico di fase I/II su un gruppo di 15 pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche autologhe nelle 6 settimane successive alla diagnosi di diabete di tipo 1 utilizzando un protocollo immunosoppressivo non mieloablativo con ciclofosfamide e globuline antitimociti. Quattordici dei 15 pazienti hanno corretto la dipendenza dall'insulina (la durata maggiore è al momento fino a 35 mesi) e simultaneamente i livelli di peptide C sono aumentati in modo sostanziale rispetto ai valori pre-intervento. Recentemente, Haller ha riportato i dati sviluppati all'Università della Florida<sup>152</sup> sull'utilizzo dell'infusione del cordone ombelicale autologo in pazienti con diabete

mellito di tipo 1 all'esordio (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00305344). Undici pazienti di età compresa tra i 2 e i 10 anni, di cui era disponibile il sangue del cordone ombelicale, sono stati infusi al momento dell'esordio della malattia e l'andamento metabolico comparato a 6 mesi di distanza con casi controllo. I risultati hanno mostrato valori di emoglobina glicosilata e fabbisogno insulinico significativamente più bassi, con una possibile preservazione della secrezione di peptide C nei pazienti infusi con il cordone ombelicale. Da sottolineare che in entrambi gli studi non è stato possibile chiarire se il beneficio metabolico della procedura fosse dovuta alla infusione delle cellule staminali ematopoietiche o alla immunomodulazione indotta dalla procedura.

La possibilità di utilizzare una infusione arteriosa di cellule mononucleate di derivazione midollare direttamente a livello del pancreas attraverso l'arteria splenica con finalità puramente legata alla rigenerazione beta cellulare autologa, in assenza di trattamenti immunosoppressori, è stata riportata nel 2005 dal gruppo argentino diretto da Fernandez-Vina. Nonostante i dati riportati al 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Cell Biology di San Francisco nel 2005 mostrassero un enorme beneficio della procedura nel paziente diabetico di tipo 2 (sospensione della terapia farmacologica nell'84% dei pazienti con diabete di tipo 2 trattati) i dati non sono stati al momento pubblicati. Uno studio clinico simile di fase I/II è in corso al momento alla Shandong University in Cina (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00465478).

## Differenziazione di cellule beta a partire da cellule staminali/progenitrici non pancreatiche: altre fonti

Molti studi hanno riportato la possibilità di differenziare cellule produttrici di insulina a partire da cellule adulte ottenute dal cervello<sup>153</sup>, dalla cute<sup>154</sup>, dalle ghiandole salivari<sup>155</sup> dalla milza<sup>156</sup>. L'interpretazione dei dati che suggeriscono una così ampia plasticità rimane controversa. Alcuni degli studi sono stati successivamente non confermati da altri gruppi come nel caso della milza<sup>157-159</sup> mentre nel caso delle cellule staminali neurali<sup>153</sup> per ora manca una validazione che si tratti di vere beta cellule e non di neuroni che esprimono bassi livelli di insulina. Infatti, a dispetto della loro diversa origine embrionale, il programma di espressione genica dei neuroni e delle beta cellule durante lo sviluppo è sorprendentemente simile, probabilmente dovuto alle fisiologiche similitudini nella funzione secretoria e nell'accoppiamento elettrico.

La dimostrazione dell'esistenza di cellule staminali multipotenti o addirittura totipotenti a livello del liquido amniotico<sup>160</sup>, della placenta<sup>161,162</sup> e delle gonadi adulte<sup>163,164</sup> ha spinto a valutare la possibilità di ottenere cellule insulino-secerenti a partire da queste fonti<sup>165,166</sup>. Anche in questo caso i dati al momento disponibili sono limitati e l'effettiva potenzialità di queste fonti per la terapia del diabete mellito dovrà essere confermata nei prossimi anni.

## Differenziazione di cellule beta a partire da cellule staminali embrionali

Le cellule staminali embrionali (ES), in confronto a tutte le altre potenziali risorse di cellule beta, hanno alcuni vantaggi teorici: possono essere derivate dallo stesso paziente, hanno una illimitata capacità di espansione e, quando sono messe nel corretto contesto (per esempio embrione durante lo sviluppo), sono in grado di dare vita a tutte le tipologie cellulari del corpo, comprese le cellule beta. Il primo studio che ha riportato la generazione di cellule produttrici di insulina a partire da cellule staminali embrionali di topo risale al 2000<sup>167</sup>. Utilizzando un sistema di *cell trapping*, Soria è stato in grado di ottenere un clone cellulare secernente insulina a partire da ES indifferenziate. Cluster cellulari ottenuti dal clone, una volta trapiantati nel topo diabetico, si sono dimostrati in grado di indurre normoglicemia anche se il numero di cellule insulino-positivo ottenute era molto piccolo. La possibilità di ottenere strutture simili alle isole con capacità di secernere insulina in modo regolato *in vitro* e *in vivo* è stata successivamente dimostrata da altri gruppi nel topo<sup>168-173</sup>, nella scimmia<sup>174</sup> e nell'uomo<sup>175-180</sup>. Tuttavia la ricerca in questo campo è attraversata da molte controversie. In genere le cellule generate sono poche, non mostrano un contenuto insulinico significativo e una secrezione regolata in modo fisiologico. Per alcuni studi è stato dimostrato che le cellule positive per insulina generate da ES in realtà non sono in grado di sintetizzare insulina de novo ma la positività sarebbe legata all'uptake di insulina dal medium di coltura<sup>181,182</sup>. Inoltre Milne ha suggerito che le ES nel topo differenziano rapidamente in endoderma extraembrionale, suggerendo che le cellule insulino-positivo derivate non siano autentiche cellule beta<sup>183</sup>. Più in generale una limitazione cruciale per l'utilizzo delle ES nel paziente diabetico rimane il potenziale tumorigenico<sup>169,170,184</sup>. Oltre alle questioni scientifiche rimangono poi aperte le problematiche etiche legate all'utilizzo di materiale di origine embrionale. Al di là di questo, i recenti solidi avanzamenti nel campo della differenziazione di cellule staminali embrionali umane in beta cellule<sup>177,185</sup> propongono questo approccio come una delle alternative più promettenti per la futura terapia cellulare del diabete.

## Diabete mellito: un'opportunità per la terapia con cellule staminali?

Oltre alla possibilità di differenziazione in cellule produttrici di insulina, le cellule staminali hanno potenzialmente altri differenti campi di applicazione nella terapia del diabete mellito (Tab. 3).

Accanto alla possibilità di rigenerare il patrimonio beta cellulare, negli ultimi anni la medicina rigenerativa ha ipotizzato la possibilità di utilizzare cellule staminali e precursori per la terapia delle complicanze del diabete mellito. Un grande sforzo è attualmente in atto per identificare strategie di rigenerazione nelle patologie croniche del rene comprendenti

**Tabella 3** Applicazioni delle cellule staminali nella terapia del diabete mellito.

<b>1) Ricostruzione delle cellule beta</b>	da cellule beta	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Adulte allogeniche</li> <li>trapianto di isole o beta cellule</li> <li>– Adulte autologhe</li> <li>proliferazione beta cellulare</li> <li>transdifferenziazione epitelio-mesenchima</li> <li>– Fetali allogeniche o xenogeniche</li> </ul>
	da cellule non beta	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Adulte pancreatiche</li> <li>cellula duttale, acinare</li> <li>cellula staminale del pancreas</li> <li>– Adulte extrapancreatiche</li> <li>epatociti</li> <li>cellule staminali midollari</li> <li>cellule staminali neuronali</li> <li>cellule staminali gonadiche</li> <li>– Fetali (amniociti)</li> <li>– Staminali embrionali</li> </ul>
<b>2) Trattamento delle complicanze</b>	nefropatia	Rigenerazione del rene
	neuropatia	Rivascolarizzazione
	vasculopatia periferica	Rivascolarizzazione
	cardiopatia ischemica	Riparazione tissutale
<b>3) Immunomodulazione</b>	autoimmunità	Trapianto non mieloablativo
		autologo di cellule staminali
	alloimmunità	Trapianto allogenico di cellule
	in trapianto di isole	staminali ematopoietiche

anche la nefropatia diabetica. Data l'impraticabilità al momento di generare *in vitro* il rene in toto, molti studi si sono indirizzati alla possibilità di trapiantare precursori renali. Una delle strategie è quella di integrare nel rene nuovi nefroni<sup>186</sup>. L'impianto del metanefro in topi o ratti adulti (intraperitoneale o sotto la capsula renale) si è dimostrato in grado di dar vita a glomeruli vascolarizzati e alla maturazione di tubuli senza però connessione al sistema escretore del rene nativo<sup>187-189</sup>. Ugualmente il metanefro embrionale umano<sup>190,191</sup> è in grado, dopo impianto nel ratto, di sviluppare nefroni maturi capaci di produrre urina, pur in assenza di sviluppo dell'urettere. Questi studi hanno dimostrato che l'impianto di tessuto renale embrionale in un ricevente e la sua susseguente maturazione a nefrone adulto funzionale è un processo possibile, anche se molti aspetti di questo approccio rimangono problematici, tra i quali la reale capacità funzionale del nuovo tessuto, la possibilità di ottenere lo stesso risultato in un milieu uremico e/o in un rene patologico e l'eticità dell'eventuale utilizzo di materiale di origine embrionale umano. Una seconda strategia in studio è quella di riparare il rene *in situ* attraverso l'utilizzo di cellule staminali organo-derivate o midollo osseo-derivate. Il rene, come altri organi, sembra possedere delle nicchie staminali identificate secondo gli studi a livello della papilla renale<sup>192</sup>, del tubulo renale<sup>193</sup>, della capsula di Bowman<sup>194</sup> o della regione corticale<sup>195</sup>. La potenzialità terapeutica di queste cellule nelle patologie croniche renali come la nefropatia diabetica non è al momento chiara,

né esiste consenso su quali siano i marker per isolare eventualmente queste componenti dal rene adulto. Collateralmente alla possibilità di identificare cellule staminali intrarenali, numerosi lavori hanno evidenziato un possibile contributo del midollo osseo ai fenomeni di riparazione renale dopo un'insufficienza renale acuta per ischemia e ripercussione<sup>196-199</sup>, o in modelli sperimentali e clinici di danno renale quali glomerulonefriti<sup>200</sup> o microangiopatia trombotica<sup>201</sup>. Recentemente il potenziale contributo delle cellule staminali del midollo osseo nella riparazione renale è stato però messo in discussione, evidenziando alcuni problemi metodologici dei precedenti studi<sup>202,203</sup>. Quindi, se al momento esiste una generale accettazione che il rene abbia un continuo turnover cellulare lento e una rapida capacità di riparazione tubulare dopo danno, l'origine cellulare del nuovo epitelio tubulare rimane controversa. Sussistono evidenze che cellule staminali derivate dal midollo osseo siano in grado di migrare a livello del rene, ma sembra che il loro contributo alla rigenerazione tubulare sia minimo rispetto a quello delle cellule residenti. Nonostante questo, la somministrazione *ex vivo* di cellule staminali mesenchimali di derivazione midollare è risultata benefica in vari modelli di insufficienza renale acuta<sup>204-207</sup>. Il meccanismo che presiede tale azione benefica è al momento motivo di discussione. La transdifferenziazione o la fusione delle cellule staminali mesenchimali sono considerati eventi di peso irrilevante, mentre giocherebbe un ruolo chiave la capacità delle cellule staminali mesenchima-

li di modificare il microambiente renale inducendo dedifferenziazione e proliferazione delle cellule tubulari sopravvissute o differenziazione di eventuali cellule staminali residenti. Alcune evidenze sperimentali suggeriscono un ruolo potenziale delle cellule staminali midollari non solo nei processi riparativi del tubulo, ma anche del glomerulo, modulando le cellule endoteliali e mesangiali<sup>204-206</sup>, suggerendo un potenziale terapeutico anche nel campo delle nefropatie croniche quali quella diabetica<sup>142</sup>.

Un ruolo determinante sia nella patogenesi sia nella terapia delle complicanze del diabete è giocato dalle cellule progenitrici endoteliali (EPC, *endothelial progenitor cell*). Le EPC sono cellule derivate dal midollo osseo coinvolte nella neovascologenesi e nella omeostasi endoteliale dell'adulto<sup>208,209</sup>. È stato suggerito che una bassa concentrazione di EPC nel sangue periferico possa avere un ruolo nella malattia cardiovascolare, nelle complicanze macrovascolari e microvascolari del diabete<sup>210-215</sup>. D'altra parte, nella eziopatogenesi della retinopatia proliferativa diabetica le EPC sarebbero coinvolte nella neogenesi vascolare<sup>216-220</sup>. Al di là del ruolo giocato nella eziopatogenesi delle complicanze, le EPC sono attualmente in studio anche in trial clinici per la terapia della neuropatia<sup>221-223</sup> (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00282685), della cardiopatia e dell'ischemia critica degli arti del paziente diabetico<sup>215,224-226</sup> (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00434616). Analogamente alle EPC, anche le cellule staminali mesenchimali sono state utilizzate per la riparazione tissutale delle ulcere del piede diabetico<sup>227-229</sup> (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00292357).

Infine le cellule staminali trovano una potenziale applicazione nella terapia del diabete mellito di tipo 1 in relazione alla loro capacità immunomodulatoria<sup>230</sup>. È infatti da ricordare che il diabete mellito di tipo 1 è una patologia cronica su base autoimmune. L'utilizzo di fonti cellulari alternative autologhe per la sostituzione funzionale delle cellule beta è destinata a fallire se non si inibisce la risposta autoimmune. Ovviamente più problematico ancora è l'utilizzo di fonti allogeniche in cui alla risposta autoimmune si associa la risposta alloimmune. Non è compito specifico di questo articolo esaminare la letteratura sulle potenzialità immunomodulatorie delle cellule staminali, ma si vogliono comunque riportare due esempi di un utilizzo delle cellule staminali per la regolazione del sistema immune.

Il primo esempio è il già citato approccio del trapianto di cellule staminali ematopoietiche autologhe nelle 6 settimane successive alla diagnosi di diabete di tipo 1<sup>151</sup>. Questo studio risulta paradigmatico per la descrizione della problematica dei costi/benefici che terapie di tipo cellulare, comprese quelle con cellule staminali, pongono. Lo studio ha permesso di dimostrare la possibilità di ottenere un ampio periodo di insulino-indipendenza dopo l'esordio del diabete di tipo 1 (8/15 dei pazienti hanno mantenuto l'insulino-indipendenza per più di un anno, che è il risultato clinico migliore fino a ora ottenuto nella terapia del diabete di tipo 1 all'esordio). Al di là dei risultati clinici e della comprensione del meccanismo di azione, rimane comunque aperta la problematica del rapporto costo/beneficio della procedura. Fortunatamente nello studio di Voltarelli non c'è stata mortalità correlata alla procedura, ma è facile pensare che questo evento possa accadere quando si vada a trattare una coorte più ampia di pazienti. Infatti, in un

recente studio in cui 50 pazienti portatori di LES sono stati trattati in modo simile sono stati riportati due eventi fatali<sup>231</sup>. Inoltre, nello studio di Voltarelli il 26% dei pazienti ha sviluppato complicanze minori, maggiori o tardive. Solo il risultato del monitoraggio della funzione beta cellulare nei prossimi mesi ci permetterà di valutare se il rapporto costi/benefici di questo approccio sia tale da giustificare la procedura.

Un secondo esempio di utilizzo di cellule staminali a scopo immunomodulatorio è lo studio in corso presso il Diabetes Research Institute di Miami in Florida (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00315614). In questo caso pazienti diabetici di tipo 1 sottoposti a trapianto di isole pancreatiche solitario ricevono, accanto alla terapia immunosoppressiva, una infusione di cellule staminali ematopoietiche CD34+ purificate del donatore. L'obiettivo dello studio è ottenere una condizione di microchimerismo immunologico che permetta l'instaurarsi di una condizione di tolleranza immunologica e quindi la sospensione della terapia immunosoppressiva. Il completamento dello studio è atteso per dicembre del 2010.

## Conclusioni

Il grandissimo potenziale terapeutico ha reso la ricerca sulle cellule staminali per la terapia del diabete un settore di grande interesse. Nonostante questo, il campo risulta molto controverso e difficoltoso. Mancano ancora molte informazioni riguardo ai meccanismi molecolari e ai *pathway* di segnali che controllano l'espansione e la differenziazione delle cellule staminali in cellule beta produttrici di insulina. Molti risultati sono stati ottenuti da modelli animali e da linee cellulari e non è ancora chiaro se cellule umane primarie possano essere manipolate nello stesso modo. La generazione di cellule insulino-produttrici non sempre è stata valutata con criteri rigorosi e la semplice espressione di insulina non è di per sé sufficiente a riconoscere una cellula come cellula beta. Esiste inoltre la difficoltà di modelli *in vivo* nell'uomo che ci permettano di valutare la crescita e la proliferazione delle cellule beta e il controllo della tumorigenicità. Infine non è da sottovalutare il fatto che il diabete mellito, sia esso di tipo 1 o di tipo 2, non è caratterizzato da un danno acuto a carico delle cellule beta (come nell'ischemia) che, pur determinando la morte delle cellule, si esaurisce nel tempo. Sia la condizione di insulino-resistenza sia l'autoimmunità permangono invariate se non modificate anche esse in termini terapeutici e un'eventuale terapia con "nuove cellule beta" è destinata a fallire in breve tempo se non accompagnata dalla correzione della noxa patogena primaria. Nonostante questo, è presumibile che la terapia cellulare per il diabete mellito si arricchirà nei prossimi anni di nuove sorgenti di cellule produttrici di insulina ottenute grazie agli studi nel campo delle cellule staminali.

## Fonti di finanziamento

Questo lavoro è stato supportato da Telethon Italy e Juvenile Diabetes Research Foundation (JT01Y01), Ministero della

Salute (Ricerca Finalizzata RF041234), Ministero della Università (COFIN 2005), EFSD/JDRF/Novo Nordisk Type 1 Diabetes Research Programme, CARIPLO. Valeria Sordi è PhD student alla Ludwig-Maximilians University di Munich, Germania.

## Conflitto di interessi

Nessuno.

## Bibliografia

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. Diabetes Care 2004;27:1047-53.
2. Faber OK, Binder C. *C-peptide response to glucagon. A test for the residual beta-cell function in diabetes mellitus*. Diabetes 1977;26:605-10.
3. Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, Mathieu C, Kaufman L, Hale G et al. *Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes*. N Engl J Med 2005;352:2598-608.
4. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. Diabetes 2003;52:102-10.
5. Hu FB, Stampfer MJ, Solomon CG, Liu S, Willett WC, Speizer FE et al. *The impact of diabetes mellitus on mortality from all causes and coronary heart disease in women: 20 years of follow-up*. Arch Intern Med 2001;161:1717-23.
6. Franco OH, Steyerberg EW, Hu FB, Mackenbach J, Nusselder W. *Associations of diabetes mellitus with total life expectancy and life expectancy with and without cardiovascular disease*. Arch Intern Med 2007;167:1145-51.
7. Clarke WL, Kovatchev B. *The artificial pancreas: how close are we to closing the loop?* Pediatr Endocrinol Rev 2007;4:314-6.
8. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP et al. *International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation*. N Engl J Med 2006;355:1318-30.
9. Butler PC, Meier JJ, Butler AE, Bhushan A. *The replication of beta cells in normal physiology, in disease and for therapy*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 2007;3:758-68.
10. Lipsett M, Aikin R, Hanley S, Al-Maleek J, Laganieri S, Rosenberg L. *Islet neogenesis: a potential therapeutic tool in type 1 diabetes*. Int J Biochem Cell Biol 2006;38:715-20.
11. Kassem SA, Ariel I, Thornton PS, Scheimberg I, Glaser B. *Beta-cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy*. Diabetes 2000;49:1325-33.
12. Bock T, Kyhnel A, Pakkenberg B, Buschard K. *The postnatal growth of the beta-cell mass in pigs*. J Endocrinol 2003;179:245-52.
13. Montanya E, Nacher V, Biarnes M, Soler J. *Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the life-span in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy*. Diabetes 2000;49:1341-6.
14. Kloppel G, Lohr M, Habich K, Oberholzer M, Heitz PU. *Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited*. Surv Synth Pathol Res 1985;4:110-25.
15. Pick A, Clark J, Kubstrup C, Levisetti M, Pugh W, Bonner-Weir S et al. *Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat*. Diabetes 1998;47:358-64.
16. Bock T, Pakkenberg B, Buschard K. *Increased islet volume but unchanged islet number in ob/ob mice*. Diabetes 2003;52:1716-22.
17. Tomita T, Doull V, Pollock HG, Krizsan D. *Pancreatic islets of obese hyperglycemic mice (ob/ob)*. Pancreas 1992;7:367-75.
18. Wang Q, Brubaker PL. *Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice*. Diabetologia 2002;45:1263-73.
19. Gapp DA, Leiter EH, Coleman DL, Schwizer RW. *Temporal changes in pancreatic islet composition in C57BL/6J-db/db (diabetes) mice*. Diabetologia 1983;25:439-43.
20. Van Assche FA, Aerts L, De Prins F. *A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy*. Br J Obstet Gynaecol 1978;85:818-20.
21. Blondeau B, Garofano A, Czernichow P, Breant B. *Age-dependent inability of the endocrine pancreas to adapt to pregnancy: a long-term consequence of perinatal malnutrition in the rat*. Endocrinology 1999;140:4208-13.
22. Scaglia L, Smith FE, Bonner-Weir S. *Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas*. Endocrinology 1995;136:5461-8.
23. Marynissen G, Aerts L, Van Assche FA. *The endocrine pancreas during pregnancy and lactation in the rat*. J Dev Physiol 1983;5:373-81.
24. Blume N, Skouv J, Larsson LI, Holst JJ, Madsen OD. *Potent inhibitory effects of transplantable rat glucagonomas and insulinomas on the respective endogenous islet cells are associated with pancreatic apoptosis*. J Clin Invest 1995;96:2227-35.
25. Rhodes CJ. *Type 2 diabetes – a matter of beta-cell life and death?* Science 2005;307(5708):380-4.
26. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. *Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation*. Nature 2004;429(6987):41-6.
27. Nir T, Melton DA, Dor Y. *Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration*. J Clin Invest 2007;117:2553-61.
28. Dor Y. *Beta-cell proliferation is the major source of new pancreatic beta cells*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 2006;2:242-3.
29. Teta M, Rankin MM, Long SY, Stein GM, Kushner JA. *Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors*. Dev Cell 2007;12:817-26.
30. Uchida T, Nakamura T, Hashimoto N, Matsuda T, Kotani K, Sakae H et al. *Deletion of Cdkn1b ameliorates hyperglycemia by maintaining compensatory hyperinsulinemia in diabetic mice*. Nat Med 2005;11:175-82.
31. Georgia S, Bhushan A. *Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass*. J Clin Invest 2004;114:963-8.
32. Kushner JA, Ciemerych MA, Sicinska E, Wartschow LM, Teta M, Long SY et al. *Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic beta-cell growth*. Mol Cell Biol 2005;25:3752-62.
33. Butler AE, Janson J, Soeller WC, Butler PC. *Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid*. Diabetes 2003;52:2304-14.
34. Bonner-Weir S, Trent DF, Weir GC. *Partial pancreatectomy in*

- the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release. *J Clin Invest* 1983;71:1544-53.
35. De Leon DD, Deng S, Madani R, Ahima RS, Drucker DJ, Stoffers DA. Role of endogenous glucagon-like peptide-1 in islet regeneration after partial pancreatectomy. *Diabetes* 2003;52:365-71.
  36. Plachot C, Movassat J, Portha B. Impaired beta-cell regeneration after partial pancreatectomy in the adult Goto-Kakizaki rat, a spontaneous model of type II diabetes. *Histochem Cell Biol* 2001;116:131-9.
  37. Menge BA, Tannapfel A, Belyaev O, Drescher R, Muller C, Uhl W et al. Partial pancreatectomy in adult humans does not provoke beta cell regeneration. *Diabetes* 2008;57:142-9.
  38. Robertson RP, Lanz KJ, Sutherland DE, Seaquist ER. Relationship between diabetes and obesity 9 to 18 years after hemipancreatectomy and transplantation in donors and recipients. *Transplantation* 2002;73:736-41.
  39. Matveyenko AV, Veldhuis JD, Butler PC. Mechanisms of impaired fasting glucose and glucose intolerance induced by an approximate 50% pancreatectomy. *Diabetes* 2006;55:2347-56.
  40. Stagner JL, Samols E. Deterioration of islet beta-cell function after hemipancreatectomy in dogs. *Diabetes* 1991;40:1472-9.
  41. Ritzel RA, Butler PC. Replication increases beta-cell vulnerability to human islet amyloid polypeptide-induced apoptosis. *Diabetes* 2003;52:1701-8.
  42. Beattie GM, Montgomery AM, Lopez AD, Hao E, Perez B, Just ML et al. A novel approach to increase human islet cell mass while preserving beta-cell function. *Diabetes* 2002;51:3435-9.
  43. Suarez-Pinzon WL, Yan Y, Power R, Brand SJ, Rabinovitch A. Combination therapy with epidermal growth factor and gastrin increases beta-cell mass and reverses hyperglycemia in diabetic NOD mice. *Diabetes* 2005;54:2596-601.
  44. Meier JJ, Butler AE, Galasso R, Rizza RA, Butler PC. Increased islet beta cell replication adjacent to intrapancreatic gastrinomas in humans. *Diabetologia* 2006;49:2689-96.
  45. Meier JJ, Nauck MA. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in biology and pathology. *Diabetes Metab Res Rev* 2005;21:91-117.
  46. Marchetti P, Del Guerra S, Marselli L, Lupi R, Masini M, Pollera M et al. Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5535-41.
  47. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* 1998;352(9131):854-65.
  48. Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, Herman WH, Holman RR, Jones NP et al. Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N Engl J Med* 2006;355:2427-43.
  49. Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK, Kjos SL, Marroquin A, Goico J et al. Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women. *Diabetes* 2002;51:2796-803.
  50. Lin CY, Gurlo T, Haataja L, Hsueh WA, Butler PC. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by rosiglitazone protects human islet cells against human islet amyloid polypeptide toxicity by a phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:6678-86.
  51. Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 2007;356:2457-71.
  52. Lupi R, Del Guerra S, Bugliani M, Boggi U, Mosca F, Torri S et al. The direct effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitors, zofenoprilat and enalaprilat, on isolated human pancreatic islets. *Eur J Endocrinol* 2006;154:355-61.
  53. Bosch J, Yusuf S, Gerstein HC, Pogue J, Sheridan P, Dagenais G et al. Effect of ramipril on the incidence of diabetes. *N Engl J Med* 2006;355:1551-62.
  54. Maedler K, Carr RD, Bosco D, Zuellig RA, Berney T, Donath MY. Sulfonylurea induced beta-cell apoptosis in cultured human islets. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:501-6.
  55. Matthews DR, Cull CA, Stratton IM, Holman RR, Turner RC. UKPDS 26: Sulphonylurea failure in non-insulin-dependent diabetic patients over six years. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Diabet Med* 1998;15:297-303.
  56. Narushima M, Kobayashi N, Okitsu T, Tanaka Y, Li SA, Chen Y et al. A human beta-cell line for transplantation therapy to control type 1 diabetes. *Nat Biotechnol* 2005;23:1274-82.
  57. Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 2002;129:2447-57.
  58. Murtaugh LC, Melton DA. Genes, signals, and lineages in pancreas development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003;19:71-89.
  59. Vionnet N, Stoffel M, Takeda J, Yasuda K, Bell GI, Zouali H et al. Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1992;356(6371):721-2.
  60. Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* 1997;17:138-9.
  61. Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN et al. Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Genet* 1997;17:384-5.
  62. Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 1996;384(6608):458-60.
  63. Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* 1996;384(6608):455-8.
  64. Malecki MT, Jhala US, Antonellis A, Fields L, Doria A, Orban T et al. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 1999;23:323-8.
  65. Gittes GK, Galante PE, Hanahan D, Rutter WJ, Debase HT. Lineage-specific morphogenesis in the developing pancreas: role of mesenchymal factors. *Development* 1996;122:439-47.
  66. Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, Enikolopov G, Asghar Z, Wheeler MB et al. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol* 2004;22:1115-24.
  67. Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H. Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes* 2004;53:2143-52.
  68. Hao E, Tyrberg B, Itkin-Ansari P, Lakey JR, Geron I, Monosov EZ et al. Beta-cell differentiation from nonendocrine epithelial cells of the adult human pancreas. *Nat Med* 2006;12:310-6.
  69. Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* 2000;6:278-82.
  70. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarikiewicz K, Song KH, Sharma A et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7999-8004.

71. Yatoh S, Dodge R, Akashi T, Omer A, Sharma A, Weir GC et al. *Differentiation of affinity-purified human pancreatic duct cells to beta-cells*. *Diabetes* 2007;56:1802-9.
72. Kim BM, Kim SY, Lee S, Shin YJ, Min BH, Bendayan M et al. *Clusterin induces differentiation of pancreatic duct cells into insulin-secreting cells*. *Diabetologia* 2006;49:311-20.
73. Heremans Y, Van De Casteele M, Veld P, Gradwohl G, Serup P, Madsen O et al. *Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3*. *J Cell Biol* 2002;159:303-12.
74. Inada A, Nienaber C, Fonseca S, Bonner-Weir S. *Timing and expression pattern of carbonic anhydrase II in pancreas*. *Dev Dyn* 2006;235:1571-7.
75. Lardon J, Huyens N, Rooman I, Bouwens L. *Exocrine cell transdifferentiation in dexamethasone-treated rat pancreas*. *Virchows Arch* 2004;444:61-5.
76. Baeyens L, De Breuck S, Lardon J, Mfopou JK, Rooman I, Bouwens L. *In vitro generation of insulin-producing beta cells from adult exocrine pancreatic cells*. *Diabetologia* 2005;48:49-57.
77. Minami K, Okuno M, Miyawaki K, Okumachi A, Ishizaki K, Oyama K et al. *Lineage tracing and characterization of insulin-secreting cells generated from adult pancreatic acinar cells*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:15116-21.
78. Desai BM, Oliver-Krasinski J, De Leon DD, Farzad C, Hong N, Leach SD et al. *Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet beta cell, regeneration*. *J Clin Invest* 2007;117:971-7.
79. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B et al. *Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes*. *Diabetes* 2001;50:521-33.
80. Abraham EJ, Leech CA, Lin JC, Zulewski H, Habener JF. *Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells*. *Endocrinology* 2002;143:3152-61.
81. Wang R, Li J, Yashpal N, Gao N. *Nestin expression and clonal analysis of islet-derived epithelial monolayers: insight into nestin-expressing cell heterogeneity and differentiation potential*. *J Endocrinol* 2005;184:329-39.
82. Eberhardt M, Salmon P, von Mach MA, Hengstler JG, Brulport M, Linscheid P et al. *Multipotential nestin and Isl-1 positive mesenchymal stem cells isolated from human pancreatic islets*. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345:1167-76.
83. Maria-Engler SS, Correa-Giannella ML, Labriola L, Krogh K, Colin C, Lojudice FH et al. *Co-localization of nestin and insulin and expression of islet cell markers in long-term human pancreatic nestin-positive cell cultures*. *J Endocrinol* 2004;183:455-67.
84. Huang H, Tang X. *Phenotypic determination and characterization of nestin-positive precursors derived from human fetal pancreas*. *Lab Invest* 2003;83:539-47.
85. Bernardo AS, Barrow J, Hay CW, McCreath K, Kind AJ, Schnieke AE et al. *Presence of endocrine and exocrine markers in EGFP-positive cells from the developing pancreas of a nestin/EGFP mouse*. *Mol Cell Endocrinol* 2006;253:14-21.
86. Piper K, Ball SG, Turnpenny LW, Brickwood S, Wilson DI, Hanley NA. *Beta-cell differentiation during human development does not rely on nestin-positive precursors: implications for stem cell-derived replacement therapy*. *Diabetologia* 2002;45:1045-7.
87. Lardon J, Rooman I, Bouwens L. *Nestin expression in pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells*. *Histochem Cell Biol* 2002;117:535-40.
88. Klein T, Ling Z, Heimberg H, Madsen OD, Heller RS, Serup P. *Nestin is expressed in vascular endothelial cells in the adult human pancreas*. *J Histochem Cytochem* 2003;51:697-706.
89. Treutelaar MK, Skidmore JM, Dias-Leme CL, Hara M, Zhang L, Simeone D et al. *Nestin-lineage cells contribute to the microvasculature but not endocrine cells of the islet*. *Diabetes* 2003;52:2503-12.
90. Esni F, Stoffers DA, Takeuchi T, Leach SD. *Origin of exocrine pancreatic cells from nestin-positive precursors in developing mouse pancreas*. *Mech Dev* 2004;121:15-25.
91. Delacour A, Nepote V, Trumpp A, Herrera PL. *Nestin expression in pancreatic exocrine cell lineages*. *Mech Dev* 2004;121:3-14.
92. Humphrey RK, Bucay N, Beattie GM, Lopez A, Messam CA, Cirulli V et al. *Characterization and isolation of promoter-defined nestin-positive cells from the human fetal pancreas*. *Diabetes* 2003;52:2519-25.
93. Gershengorn MC, Geras-Raaka E, Hardikar AA, Raaka BM. *Are better islet cell precursors generated by epithelial-to-mesenchymal transition?* *Cell Cycle* 2005;4:380-2.
94. Ouziel-Yahalom L, Zalzman M, Anker-Kitai L, Knoller S, Bar Y, Glandt M et al. *Expansion and redifferentiation of adult human pancreatic islet cells*. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341:291-8.
95. Lechner A, Nolan AL, Blacken RA, Habener JF. *Redifferentiation of insulin-secreting cells after in vitro expansion of adult human pancreatic islet tissue*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327:581-8.
96. Gershengorn MC, Hardikar AA, Wei C, Geras-Raaka E, Marcus-Samuels B, Raaka BM. *Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells*. *Science* 2004;306(5705):2261-4.
97. Seeberger KL, Dufour JM, Shapiro AM, Lakey JR, Rajotte RV, Korbutt GS. *Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium*. *Lab Invest* 2006;86:141-53.
98. Linning KD, Tai MH, Madhukar BV, Chang CC, Reed DN Jr, Ferber S et al. *Redox-mediated enrichment of self-renewing adult human pancreatic cells that possess endocrine differentiation potential*. *Pancreas* 2004;29:e64-76.
99. Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, Mercalli A, Melzi R, Giordano T et al. *Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets*. *Blood* 2005;106:419-27.
100. Davani B, Ikonomou L, Raaka BM, Geras-Raaka E, Morton RA, Marcus-Samuels B et al. *Human islet-derived precursor cells are mesenchymal stromal cells that differentiate and mature to hormone-expressing cells in vivo*. *Stem Cells* 2007;25:3215-22.
101. Atouf F, Park CH, Pechhold K, Ta M, Choi Y, Lumelsky NL. *No evidence for mouse pancreatic {beta}-cell epithelial-mesenchymal transition in vitro*. *Diabetes* 2007;56:699-702.
102. Weinberg N, Ouziel-Yahalom L, Knoller S, Efrat S, Dor Y. *Lineage tracing evidence for in-vitro dedifferentiation, but rare proliferation, of mouse pancreatic beta-cells*. *Diabetes* 2007;56:1299-304.
103. Morton RA, Geras-Raaka E, Wilson LM, Raaka BM, Gershengorn MC. *Endocrine precursor cells from mouse islets are not generated by epithelial-to-mesenchymal transition of mature beta cells*. *Mol Cell Endocrinol* 2007;270:87-93.

104. Chase LG, Ulloa-Montoya F, Kidder BL, Verfaillie CM. *Islet-derived fibroblast-like cells are not derived via epithelial-mesenchymal transition from Pdx-1 or insulin-positive cells.* Diabetes 2007;56:3-7.
105. Grapin-Botton A, Melton DA. *Endoderm development: from patterning to organogenesis.* Trends Genet 2000;16:124-30.
106. Deutsch G, Jung J, Zheng M, Lora J, Zaret KS. *A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm.* Development 2001;128:871-81.
107. Tosh D, Slack JM. *How cells change their phenotype.* Nat Rev Mol Cell Biol 2002;3:187-94.
108. Tosh D, Shen CN, Slack JM. *Conversion of pancreatic cells to hepatocytes.* Biochem Soc Trans 2002;30:51-5.
109. Grompe M. *Pancreatic-hepatic switches in vivo.* Mech Dev 2003;120:99-106.
110. Fujita Y, Cheung AT, Kieffer TJ. *Harnessing the gut to treat diabetes.* Pediatr Diabetes 2004;5(suppl 2):57-69.
111. Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I et al. *Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia.* Nat Med 2000;6:568-72.
112. Zalzman M, Gupta S, Giri RK, Berkovich I, Sappal BS, Karnieli O et al. *Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells.* Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:7253-8.
113. Shen CN, Horb ME, Slack JM, Tosh D. *Transdifferentiation of pancreas to liver.* Mech Dev 2003;120:107-16.
114. Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Younan P, Imaeda H, Maeda M et al. *NeuroD-beta-cellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice.* Nat Med 2003;9:596-603.
115. Miyatsuka T, Kaneto H, Kajimoto Y, Hirota S, Arakawa Y, Fujitani Y et al. *Ectopically expressed PDX-1 in liver initiates endocrine and exocrine pancreas differentiation but causes dysmorphogenesis.* Biochem Biophys Res Commun 2003;310:1017-25.
116. Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Uno K et al. *Constitutively active PDX1 induced efficient insulin production in adult murine liver.* Biochem Biophys Res Commun 2005;326:402-9.
117. Cao LZ, Tang DQ, Horb ME, Li SW, Yang LJ. *High glucose is necessary for complete maturation of Pdx1-VP16-expressing hepatic cells into functional insulin-producing cells.* Diabetes 2004;53:3168-78.
118. Sapir T, Shternhall K, Meivar-Levy I, Blumenfeld T, Cohen H, Skutelsky E et al. *Cell-replacement therapy for diabetes: Generating functional insulin-producing tissue from adult human liver cells.* Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:7964-9.
119. Zalzman M, Anker-Kitai L, Efrat S. *Differentiation of human liver-derived, insulin-producing cells toward the beta-cell phenotype.* Diabetes 2005;54:2568-75.
120. Cheung AT, Dayanandan B, Lewis JT, Korbutt GS, Rajotte RV, Bryer-Ash M et al. *Glucose-dependent insulin release from genetically engineered K cells.* Science 2000;290(5498):1959-62.
121. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR et al. *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.* Nature 2002;418(6893):41-9.
122. Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, Xia CQ, Litherland SA, Atkinson MA et al. *In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow.* Diabetes 2004;53:1721-32.
123. Chen LB, Jiang XB, Yang L. *Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells.* World J Gastroenterol 2004;10:3016-20.
124. Oh SH, Muzzonigro TM, Bae SH, LaPlante JM, Hatch HM, Petersen BE. *Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes.* Lab Invest 2004;84:607-17.
125. Moriscot C, de Fraipont F, Richard MJ, Marchand M, Savatier P, Bosco D et al. *Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro.* Stem Cells 2005;23:594-603.
126. Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U et al. *Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells.* Biochem Biophys Res Commun 2006;341:1135-40.
127. Zhao Y, Glesne D, Huberman E. *A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells.* Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:2426-31.
128. Ruhnke M, Ungefroren H, Nussler A, Martin F, Brulport M, Schormann W et al. *Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells.* Gastroenterology 2005;128:1774-86.
129. Janus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. *In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion.* J Clin Invest 2003;111:843-50.
130. Lechner A, Yang YG, Blacken RA, Wang L, Nolan AL, Habener JF. *No evidence for significant transdifferentiation of bone marrow into pancreatic beta-cells in vivo.* Diabetes 2004;53:616-23.
131. Choi JB, Uchino H, Azuma K, Iwashita N, Tanaka Y, Mochizuki H et al. *Little evidence of transdifferentiation of bone marrow-derived cells into pancreatic beta cells.* Diabetologia 2003;46:1366-74.
132. Taneera J, Rosengren A, Renstrom E, Nygren JM, Serup P, Rorsman P et al. *Failure of transplanted bone marrow cells to adopt a pancreatic beta-cell fate.* Diabetes 2006;55:290-6.
133. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M et al. *Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes.* Nature 2003;422(6934):897-901.
134. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. *Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells.* Science 2002;297(5590):2256-9.
135. Butler AE, Huang A, Rao PN, Bhushan A, Hogan WJ, Rizza RA et al. *Hematopoietic stem cells derived from adult donors are not a source of pancreatic beta-cells in adult nondiabetic humans.* Diabetes 2007;56:1810-6.
136. Luo L, Badiavas E, Luo JZ, Maizel A. *Allogeneic bone marrow supports human islet beta cell survival and function over six months.* Biochem Biophys Res Commun 2007;361:859-64.
137. Hasegawa Y, Ogihara T, Yamada T, Ishigaki Y, Imai J, Uno K et al. *Bone marrow (BM) transplantation promotes beta-cell regeneration after acute injury through BM cell mobilization.* Endocrinology 2007;148:2006-15.
138. Mathews V, Hanson PT, Ford E, Fujita J, Polonsky KS, Graubert TA. *Recruitment of bone marrow-derived endothelial cells to sites of pancreatic beta-cell injury.* Diabetes 2004;53:91-8.
139. Li FX, Zhu JW, Tessem JS, Beilke J, Varela-Garcia M, Jensen

- J et al. *The development of diabetes in E2f1/E2f2 mutant mice reveals important roles for bone marrow-derived cells in preventing islet cell loss*. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:12935-40.
140. Banerjee M, Kumar A, Bhonde RR. *Reversal of experimental diabetes by multiple bone marrow transplantation*. Biochem Biophys Res Commun 2005;328:318-25.
  141. Izumida Y, Aoki T, Yasuda D, Koizumi T, Suganuma C, Saito K et al. *Hepatocyte growth factor is constitutively produced by donor-derived bone marrow cells and promotes regeneration of pancreatic beta-cells*. Biochem Biophys Res Commun 2005;333:273-282.
  142. Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD et al. *Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice*. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103:17438-43.
  143. Hutson EL, Boyer S, Genever PG. *Rapid isolation, expansion, and differentiation of osteoprogenitors from full-term umbilical cord blood*. Tissue Eng 2005;11:1407-20.
  144. Zhao Y, Wang H, Mazzone T. *Identification of stem cells from human umbilical cord blood with embryonic and hematopoietic characteristics*. Exp Cell Res 2006;312:2454-64.
  145. Pessina A, Eletti B, Croera C, Savalli N, Diodovich C, Gribaldo L. *Pancreas developing markers expressed on human mononucleated umbilical cord blood cells*. Biochem Biophys Res Commun 2004;323:315-22.
  146. Yoshida S, Ishikawa F, Kawano N, Shimoda K, Nagafuchi S, Shimoda S et al. *Human cord blood-derived cells generate insulin-producing cells in vivo*. Stem Cells 2005;23:1409-16.
  147. Denner L, Bodenbun Y, Zhao JG, Howe M, Cappel J, Tilton RG et al. *Directed engineering of umbilical cord blood stem cells to produce C-peptide and insulin*. Cell Prolif 2007;40:367-80.
  148. Sun B, Roh KH, Lee SR, Lee YS, Kang KS. *Induction of human umbilical cord blood-derived stem cells with embryonic stem cell phenotypes into insulin producing islet-like structure*. Biochem Biophys Res Commun 2007;354:919-23.
  149. Ende N, Chen R, Reddi AS. *Transplantation of human umbilical cord blood cells improves glycemia and glomerular hypertrophy in type 2 diabetic mice*. Biochem Biophys Res Commun 2004;321:168-71.
  150. Ende N, Chen R, Reddi AS. *Effect of human umbilical cord blood cells on glycemia and insulinitis in type 1 diabetic mice*. Biochem Biophys Res Commun 2004;325:665-9.
  151. Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, Oliveira MC, Moraes DA, Pieroni F et al. *Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus*. JAMA 2007;297:1568-76.
  152. Haller M, Viener H, Brusko T, Wasserfall C, McGrail K, Cogle C et al. *Insulin requirements, HbA<sub>1c</sub> and stimulated C-peptide following autologous umbilical cord blood transfusion in children with T1D*. Abstract presented at: Annual Meeting of the American Diabetes Association, Scientific Sessions; June 22-26, 2007 Chicago, IL. 2007.
  153. Hori Y, Gu X, Xie X, Kim SK. *Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells*. PLoS Med 2005;2:e103.
  154. Shi CM, Cheng TM. *Differentiation of dermis-derived multipotent cells into insulin-producing pancreatic cells in vitro*. World J Gastroenterol 2004;10:2550-2.
  155. Hisatomi Y, Okumura K, Nakamura K, Matsumoto S, Satoh A, Nagano K et al. *Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages*. Hepatology 2004;39:667-75.
  156. Kodama S, Kuhlreiber W, Fujimura S, Dale EA, Faustman DL. *Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice*. Science 2003;302(5648):1223-7.
  157. Chong AS, Shen J, Tao J, Yin D, Kuznetsov A, Hara M et al. *Reversal of diabetes in non-obese diabetic mice without spleen cell-derived beta cell regeneration*. Science 2006; 311(5768):1774-5.
  158. Nishio J, Gaglia JL, Turvey SE, Campbell C, Benoist C, Mathis D. *Islet recovery and reversal of murine type 1 diabetes in the absence of any infused spleen cell contribution*. Science 2006;311(5768):1775-8.
  159. Suri A, Calderon B, Esparza TJ, Frederick K, Bittner P, Unanue ER. *Immunological reversal of autoimmune diabetes without hematopoietic replacement of beta cells*. Science 2006; 311(5768):1778-80.
  160. De Coppi P, Bartsch G, Jr., Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L et al. *Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy*. Nat Biotechnol 2007;25:100-6.
  161. Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE et al. *Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta*. Stem Cells 2004;22:1338-45.
  162. Yen BL, Huang HI, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M et al. *Isolation of multipotent cells from human term placenta*. Stem Cells 2005;23:3-9.
  163. Seandel M, James D, Shmelkov SV, Falcatori I, Kim J, Chavala S et al. *Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors*. Nature 2007;449 (7160):346-50.
  164. Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH et al. *Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis*. Nature 2006;440(7088):199-203.
  165. Chang CM, Kao CL, Chang YL, Yang MJ, Chen YC, Sung BL et al. *Placenta-derived multipotent stem cells induced to differentiate into insulin-positive cells*. Biochem Biophys Res Commun 2007;357:414-20.
  166. Chien CC, Yen BL, Lee FK, Lai TH, Chen YC, Chan SH et al. *In vitro differentiation of human placenta-derived multipotent cells into hepatocyte-like cells*. Stem Cells 2006;24:1759-68.
  167. Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig JA, Martin F. *Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice*. Diabetes 2000;49:157-62.
  168. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. *Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets*. Science 2001; 292(5520):1389-94.
  169. Blyszczuk P, Wobus AM. *In vitro differentiation of embryonic stem cells into the pancreatic lineage*. Methods Mol Biol 2006;330:373-85.
  170. Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, Heit JJ, Cahoy JD, Kim SK. *Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:16105-10.
  171. Leon-Quinto T, Jones J, Skoudy A, Burcin M, Soria B. *In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells*. Diabetologia 2004;47:1442-51.
  172. Miyazaki S, Yamato E, Miyazaki J. *Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells*. Diabetes 2004;53:1030-7.

173. Moritoh Y, Yamato E, Yasui Y, Miyazaki S, Miyazaki J. *Analysis of insulin-producing cells during in vitro differentiation from feeder-free embryonic stem cells*. Diabetes 2003;52:1163-8.
174. Lester LB, Kuo HC, Andrews L, Nauert B, Wolf DP. *Directed differentiation of rhesus monkey ES cells into pancreatic cell phenotypes*. Reprod Biol Endocrinol 2004;2:42.
175. Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J. *Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters*. Stem Cells 2004;22:265-74.
176. Baharvand H, Jafari H, Massumi M, Ashtiani SK. *Generation of insulin-secreting cells from human embryonic stem cells*. Dev Growth Differ 2006;48:323-32.
177. 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 2006;24:1392-401.
178. Jiang W, Shi Y, Zhao D, Chen S, Yong J, Zhang J et al. *In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells*. Cell Res 2007;17:333-44.
179. Shim JH, Kim SE, Woo DH, Kim SK, Oh CH, McKay R et al. *Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate*. Diabetologia 2007;50:1228-38.
180. Jiang J, Au M, Lu K, Eshpeter A, Korbitt G, Fisk G et al. *Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells*. Stem Cells 2007;25:1940-53.
181. Rajagopal J, Anderson WJ, Kume S, Martinez OI, Melton DA. *Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake*. Science 2003;299(5605):363.
182. Hansson M, Tonning A, Frandsen U, Petri A, Rajagopal J, Englund MC et al. *Artificial insulin release from differentiated embryonic stem cells*. Diabetes 2004;53:2603-9.
183. Milne HM, Burns CJ, Kitsou-Mylona I, Luther MJ, Minger SL, Persaud SJ et al. *Generation of insulin-expressing cells from mouse embryonic stem cells*. Biochem Biophys Res Commun 2005;328(2):399-403.
184. Fujikawa T, Oh SH, Pi L, Hatch HM, Shupe T, Petersen BE. *Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells*. Am J Pathol 2005;166(6):1781-91.
185. 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 2005;23:1534-41.
186. Hammerman MR. *Growing new kidneys in situ*. Clin Exp Nephrol 2004;8:169-77.
187. Woolf AS, Palmer SJ, Snow ML, Fine LG. *Creation of a functioning chimeric mammalian kidney*. Kidney Int 1990;38:991-7.
188. Marshall D, Dilworth MR, Clancy M, Bravery CA, Ashton N. *Increasing renal mass improves survival in anephric rats following metanephros transplantation*. Exp Physiol 2007;92:263-71.
189. Rogers SA, Lowell JA, Hammerman NA, Hammerman MR. *Transplantation of developing metanephroi into adult rats*. Kidney Int 1998;54:27-37.
190. Dekel B, Burakova T, Arditti FD, Reich-Zeliger S, Milstein O, Aviel-Ronen S et al. *Human and porcine early kidney precursors as a new source for transplantation*. Nat Med 2003;9:53-60.
191. Dekel B, Reisner Y. *Embryonic committed stem cells as a solution to kidney donor shortage*. Expert Opin Biol Ther 2004;4:443-54.
192. Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q. *The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells*. J Clin Invest 2004;114(6):795-804.
193. Maeshima A, Sakurai H, Nigam SK. *Adult kidney tubular cell population showing phenotypic plasticity, tubulogenic capacity, and integration capability into developing kidney*. J Am Soc Nephrol 2006;17:188-98.
194. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F et al. *Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys*. J Am Soc Nephrol 2006;17:2443-56.
195. Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Deregibus MC, Cantino D et al. *Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney*. Am J Pathol 2005;166:545-55.
196. Imasawa T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Zhong Y, Nagasawa R, Okabe M et al. *The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells*. J Am Soc Nephrol 2001;12:1401-9.
197. Kale S, Karihaloo A, Clark PR, Kashgarian M, Krause DS, Cantley LG. *Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule*. J Clin Invest 2003;112:42-9.
198. Lin F, Cordes K, Li L, Hood L, Couser WG, Shankland SJ et al. *Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice*. J Am Soc Nephrol 2003;14:1188-99.
199. Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kim Y, Rosenberg ME. *A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure*. Kidney Int 2002;62:1285-90.
200. Rookmaaker MB, Smits AM, Tolboom H, Van't Wout K, Martens AC, Goldschmeding R et al. *Bone-marrow-derived cells contribute to glomerular endothelial repair in experimental glomerulonephritis*. Am J Pathol 2003;163:553-62.
201. Rookmaaker MB, Tolboom H, Goldschmeding R, Zwaginga JJ, Rabelink TJ, Verhaar MC. *Bone-marrow-derived cells contribute to endothelial repair after thrombotic microangiopathy*. Blood 2002;99:1095.
202. Duffield JS, Bonventre JV. *Kidney tubular epithelium is restored without replacement with bone marrow-derived cells during repair after ischemic injury*. Kidney Int 2005;68:1956-61.
203. Lin F, Moran A, Igarashi P. *Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in post-ischemic kidney*. J Clin Invest 2005;115:1756-64.
204. Kunter U, Rong S, Djuric Z, Boor P, Muller-Newen G, Yu D et al. *Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol 2006;17:2202-12.
205. Sugimoto H, Mundel TM, Sund M, Xie L, Cosgrove D, Kalluri R. *Bone-marrow-derived stem cells repair basement membrane collagen defects and reverse genetic kidney disease*. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:7321-6.
206. Li B, Morioka T, Uchiyama M, Oite T. *Bone marrow cell infusion ameliorates progressive glomerulosclerosis in an experimental rat model*. Kidney Int 2006;69:323-30.
207. Krause D, Cantley LG. *Bone marrow plasticity revisited: protection or differentiation in the kidney tubule?* J Clin Invest 2005;115:1705-8.
208. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T et al. *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. Science 1997;275(5302):964-7.
209. Cho HJ, Kim HS, Lee MM, Kim DH, Yang HJ, Hur J et al. *Mobilized endothelial progenitor cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor accelerate reendothelialization and reduce vascular inflammation after intravascular radiation*. Circulation 2003;108:2918-25.
210. Capla JM, Grogan RH, Callaghan MJ, Galiano RD, Tepper

- OM, Ceradini DJ et al. *Diabetes impairs endothelial progenitor cell-mediated blood vessel formation in response to hypoxia*. *Plast Reconstr Surg* 2007;119:59-70.
211. Fadini GP, Miorin M, Facco M, Bonamico S, Baesso I, Grego F et al. *Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus*. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1449-57.
212. Thum T, Fraccarollo D, Schultheiss M, Froese S, Galuppo P, Widder JD et al. *Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes*. *Diabetes* 2007;56:666-74.
213. Zhou B, Cao XC, Fang ZH, Zheng CL, Han ZB, Ren H et al. *Prevention of diabetic microangiopathy by prophylactic transplant of mobilized peripheral blood mononuclear cells*. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28:89-97.
214. Fadini GP, Sartore S, Schiavon M, Albiero M, Baesso I, Cabrelle A et al. *Diabetes impairs progenitor cell mobilisation after hindlimb ischaemia-reperfusion injury in rats*. *Diabetologia* 2006;49:3075-84.
215. Fadini GP, Sartore S, Albiero M, Baesso I, Murphy E, Menegolo M et al. *Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2140-6.
216. Lee IG, Chae SL, Kim JC. *Involvement of circulating endothelial progenitor cells and vasculogenic factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy*. *Eye* 2006;20:546-52.
217. Goon PK, Lip GY. *Involvement of circulating endothelial progenitor cells and vasculogenic factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy*. *Eye* 2007;21:838-9; author reply 838.
218. Kusuyama T, Omura T, Nishiya D, Enomoto S, Matsumoto R, Takeuchi K et al. *Effects of treatment for diabetes mellitus on circulating vascular progenitor cells*. *J Pharmacol Sci* 2006;102:96-102.
219. Asnaghi V, Lattanzio R, Mazzolari G, Pastore MR, Ramoni A, Maestroni A et al. *Increased clonogenic potential of circulating endothelial progenitor cells in patients with type 1 diabetes and proliferative retinopathy*. *Diabetologia* 2006;49:1109-11.
220. Fadini GP, Sartore S, Baesso I, Lenzi M, Agostini C, Tiengo A et al. *Endothelial progenitor cells and the diabetic paradox*. *Diabetes Care* 2006;29:714-6.
221. Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, Kato K, Mizubayashi R, Kamiya H et al. *Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy*. *Diabetes* 2005;54:1823-8.
222. Malik RA, Veves A, Tesfaye S. *Ameliorating human diabetic neuropathy: lessons from implanting hematopoietic mononuclear cells*. *Exp Neurol* 2006;201:7-14.
223. Hasegawa T, Kosaki A, Shimizu K, Matsubara H, Mori Y, Masaki H et al. *Amelioration of diabetic peripheral neuropathy by implantation of hematopoietic mononuclear cells in streptozotocin-induced diabetic rats*. *Exp Neurol* 2006;199:274-80.
224. Kajiguchi M, Kondo T, Izawa H, Kobayashi M, Yamamoto K, Shintani S et al. *Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia*. *Circ J* 2007;71:196-201.
225. Kawamura A, Horie T, Tsuda I, Abe Y, Yamada M, Egawa H et al. *Clinical study of therapeutic angiogenesis by autologous peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation in 92 patients with critically ischemic limbs*. *J Artif Organs* 2006;9:226-33.
226. Rota M, LeCapitaine N, Hosoda T, Boni A, De Angelis A, Padin-lruegas ME et al. *Diabetes promotes cardiac stem cell aging and heart failure, which are prevented by deletion of the p66shc gene*. *Circ Res* 2006;99:42-52.
227. Vojtassak J, Danisovic L, Kubes M, Bakos D, Jarabek L, Ulicna M et al. *Autologous biograft and mesenchymal stem cells in treatment of the diabetic foot*. *Neuro Endocrinol Lett* 2006;27(suppl 2):134-7.
228. Xia Z, Ye H, Choong C, Ferguson DJ, Platt N, Cui Z et al. *Macrophagic response to human mesenchymal stem cell and poly(epsilon-caprolactone) implantation in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice*. *J Biomed Mater Res A* 2004;71:538-48.
229. Kirana S, Stratmann B, Lammers D, Negrean M, Stirban A, Minartz P et al. *Wound therapy with autologous bone marrow stem cells in diabetic patients with ischaemia-induced tissue ulcers affecting the lower limbs*. *Int J Clin Pract* 2007;61:690-2.
230. Urban VS, Kiss J, Kovacs J, Gocza E, Vas V, Monostori E et al. *Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes*. *Stem Cells* 2008;26:244-53.
231. Burt RK, Traynor A, Statkute L, Barr WG, Rosa R, Schroeder J et al. *Nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus*. *JAMA* 2006;295:527-35.