

Diss. ETH No. 17400

**Biological quantification of murine
osteoarticular joints following
treatment using stem cell-based gene
therapy**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Kathryn Stok

B.Eng, M.Eng

born 8th September, 1976

citizen of Australia

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ralph Müller, examiner

Prof. Dr. Yuti Chernajovsky, co-examiner

2008

Summary

Cartilage defects induced by osteoarthritis (OA) or rheumatoid arthritis (RA) are currently irreversible. Available immunotherapies are limited since they target only the inflammatory process, which returns once therapy ceases, and do not restore the damaged cartilage or sclerotic bone. A new approach proposed inducing chondrocyte differentiation through genetic engineering of adult mesenchymal stem cells (MSCs). This cell-mediated gene therapy approach would for the first time directly address pathogenic processes and allow for regulated expression of engineered genes. Thus, the aim of this project was to provide quantitative endpoints to assess microstructural and architectural changes in cartilage, bone and tissue-engineered (TE) constructs associated with various MSC treatment therapies.

In order to develop these tools, three specific aims to be addressed in this work were formulated, namely;

1. Development and validation of imaging technologies for biological tissues,
2. Development and calibration of mechanical testing methods for biological tissues, and
3. Applications of biological quantification following stem cell-based gene therapy.

In response to these aims, this thesis discloses novel imaging tools designed for murine joints, as well as mechanical testing of TE constructs. The importance of the tools is their value in characterising TE constructs, cartilage and bone according to functional composition, the presence of structure-altering disease, and the efficacy of treatment therapies in restoring healthy structure.

Specifically in this work, for the first time, a combined technique using confocal laser scanning microscopy (CLSM) and micro-computed tomography (μ CT) was developed and validated for volumetric and topographical imaging of articular surfaces and underlying bone. Successful investigation of the reproducibility of CLSM for

imaging tibial cartilage was performed, as well as the subsequent image processing and analysis; resulting in intraclass correlations for the different compartments between 0.918 and 0.991. The bias of the system was also assessed, where measurements were corrected for by scaling the CLSM images to 32% of their width to match histological sections. Secondly, an algorithm for automatic generation of local femoral and tibial volumes of interest was developed, resulting in an easy-to-use procedure for bone analysis.

Additionally, method development and commissioning of a material testing apparatus for classical stress-relaxation testing of viscoelastic materials is included; particularly for TE constructs. Human MSCs were seeded in hyaluronic acid scaffolds and grown over a three week period. Their mechanical competency was compared to native, intact articular cartilage, and at their highest - Day 21 - maximum stress, σ_{MAX} (mean \pm SD: 193.3 ± 35.6 kPa) and equilibrium modulus, E_{EQ} (395.3 ± 68.6 kPa) were ten times lower than human tibial articular cartilage (σ_{MAX} : 2120 ± 580 kPa, E_{EQ} : 3492 ± 1061 kPa), and instantaneous modulus, E_{IN} (601.6 ± 108.4 kPa) was 20 times less (E_{IN} : 11095 ± 2608 kPa). Thus, this methodology was able to demonstrate increasing functional competency of the constructs with time, even though they did not achieve the same levels as native tissue. Furthermore, it was recommended that transfer to a dynamic culture system or *in vivo* transplantation would be prudent from 14 days after seeding, since this would allow for further improvement in functional capacity.

Finally, the imaging tools were combined in two separate studies to assess subchondral bone and articular cartilage changes. The first study considered a murine OA model and attempted to chart progressive architectural changes associated with the disease. The μCT analysis showed that trabecular and cortical bone changes occurred depending on the volume of interest studied, as well as the strain and age of the animal. These changes were primarily seen as bone densification of the epiphysis in the medial condyles. CLSM results showed that cartilage lesions occurred first in the medial tibial plateau; a result which was objectively measured from the specific cartilage surface of the affected tissue. Aspects of the disease became evident in both the cartilage and bone between 4 and 7 months, making it difficult to discern a separate timeline of events.

The second study considered a murine RA model, where the mice were treated with an anti-inflammatory therapy using an established system for efficient non viral gene transfer of the therapeutic product. Comparison was drawn between the therapeutic efficacy of systemic versus local gene delivery, where CLSM and μCT were employed as quantitative technologies for evaluation of cartilage and bone repair.

Three weeks after electric pulse-mediated gene transfer of a plasmid encoding a dimeric TNF receptor II in the SCID/syno-TNF mouse model, TNF α levels were decreased in the groups treated with the anti-inflammatory therapy and a tetracycline promotor. Concomitantly, increases in cartilage thickness, and decreases in specific cartilage surface were observed, matching histological scores, as well as a significant decrease in subchondral cortical bone destruction.

Zusammenfassung

Knorpelschäden, die durch Osteoarthritis oder chronischen Gelenkrheumatismus hervorgerufen werden, sind heutzutage irreversibel. Vorhandene Immuntherapien sind in ihrer Wirkung eingeschränkt, da sie nur auf den Entzündungsprozess abzielen, welcher nach Beendigung der Therapie wiederkehrt. Gleichzeitig können sie das beschädigte Knorpelgewebe aber nicht wiederherstellen. Ein neuer Ansatz fokussierte das Auslösen der Zelldifferenzierung von Chondrozyten durch genetisches Modifizieren von adulten mesenchymalen Stammzellen (MSZ). Dieser durch Zellen gesteuerte Gentherapie-Ansatz könnte zum ersten Mal direkt die pathogenen Prozesse angehen und eine regulierte Exprimierung der modifizierten Gene erlauben. Daher war das Ziel dieses Projekts, quantitative Analysen zu ermöglichen, die mikrostrukturelle und architektonische Veränderungen von Knorpelgewebe, Knochen und tissue-engineering-(TE)-Konstrukten in Verbindung mit verschiedenen MSZ-Behandlungstherapien beschreiben. So können hier drei spezifische Ziele formuliert werden, welche in dieser Dissertation behandelt werden:

1. Entwicklung und Validierung von bildgebenden Verfahren für biologisches Gewebe,
2. Entwicklung und Kalibrierung von biomechanischen Prüfmethode für biologisches Gewebe und
3. Anwendungen biologischer Quantifizierung in Anlehnung an stammzellenbasierte Gentherapie

Hinsichtlich dieser Ziele stellt diese Arbeit neue bildgebende Werkzeuge vor, die auf murine Gelenke sowie mechanisches Testen von TE-Konstrukten ausgelegt sind. Die Bedeutung dieser Tools ist ihre Fähigkeit, TE-Konstrukte zu charakterisieren; Knorpel und Knochen nach funktionaler Zusammensetzung, dem Vorhandensein von

strukturverändernden Krankheiten und der Wirksamkeit von Behandlungstherapien zur Wiederherstellung gesunder Gewebestruktur.

Speziell in dieser Arbeit wurde das erste Mal eine kombinierte Technik aus confocal laser scanning microscopy (CLSM) und micro-computed tomography (μ CT) entwickelt und für volumetrische und topographische Bildgebung von Gelenkoberflächen und angrenzendem Knochen ausgewertet. Es wurden erfolgreiche Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie als Werkzeug zur Abbildung von Gelenkknorpeln in der Tibia sowie zur anschließenden Bildverarbeitung und Analyse durchgeführt, die in intraklassen-Korrelationen der verschiedenen Bereiche zwischen 0.918 und 0.991 resultieren. Der Fehler des Gesamtsystems wurde ebenfalls bestimmt, wobei die Messungen mittels einer Skalierung der konfokalen Bilder auf 32% ihrer Breite korrigiert wurden, um mit den histologischen Abschnitten übereinzustimmen. Weiter wurde ein automatischer Algorithmus zur Bestimmung der Analysevolumen im Femur und der Tibia entwickelt, welcher eine einfach zu bedienende Prozedur zur Knochenanalyse darstellt.

Zusätzlich beinhaltet diese Arbeit Methodenentwicklung und Inbetriebnahme eines Materialprüfsystems für klassische Spannungs-Relaxations-Prüfungen von viskoelastischen Materialien; im Speziellen für künstlich erzeugte Gewebekonstrukte. Humane MSZ wurden in Hyaluronsäure-Gewebekonstrukte gesät und wuchsen über eine Zeitspanne von drei Wochen. Die mechanische Kompetenz wurde mittels einer Spannungs-Relaxations-Einbuchtungsprüfung bestimmt und mit den Werten von intakten Gelenkknorpeln verglichen. Zum Zeitpunkt der höchsten Belastung - am Tag 21 - waren Maximalspannung, σ_{MAX} (Mittelwert \pm SD: 193.3 ± 35.6 kPa) und Gleichgewichtsmodulus, E_{EQ} (395.3 ± 68.6 kPa) zehn Mal niedriger als bei menschlichem Knorpelgewebe des tibialen Gelenks (σ_{MAX} : 2120 ± 580 kPa, E_{EQ} : 3492 ± 1061 kPa), und der Momentanmodulus, E_{IN} (601.6 ± 108.4 kPa) war 20 Mal geringer (E_{IN} : 11095 ± 2608 kPa). Daher war diese Methode in der Lage, zu zeigen, dass die funktionale Kompetenz der Konstrukte mit der Zeit zunahm, obwohl sie das Niveau des nativen Gewebes nicht erreichten.

Letztlich wurden die entwickelten Werkzeuge zur Erfüllung des dritten Ziels in zwei verschiedenen Studien kombiniert, um die Veränderungen des Gelenkknorpels und des angrenzenden Knochens zu ermitteln. Die erste Studie beschäftigte sich mit einem Osteoarthritis-Modell in der Maus und versuchte, die progressiven strukturellen Veränderungen der Krankheit aufzuzeigen. Es wurde erwiesen, dass trabekuläre und kortikale Knochenänderungen abhängig vom untersuchten Volumen sowie vom Stamm und dem Alter der Tiere auftreten; Änderungen, die primär als

ein Auffüllen der Epiphyse in den medialen Kondylen angesehen werden können. Die konfokale Bildgebung zeigte zudem, dass Knorpelläsionen zuerst im medialen Plateau der Tibia auftreten. Dies ist ein Resultat, welches objektiv mittels der Oberfläche-zu-Volumen-Ratio des betroffenen Knorpelgewebes gemessen wurde. Aspekte dieser Krankheit traten sowohl im Knorpel- als auch im Knochengewebe in einem Zeitraum zwischen 4 und 7 Monaten auf, was es schwierig machte, eine zeitliche Abfolge der Ereignisse zu spezifizieren.

Die zweite Studie betrachtet ein Gelenkrheumatismus-Modell in der Maus, in welchem die Tiere mit einer entzündungshemmenden Therapie behandelt wurden, die ein etabliertes System zum effizienten nicht-viralen Gen-Transfer des Produkts nutzt. Verglichen wurde die therapeutische Effizienz der systemischen Verbreitung mit jener der lokalen Genabgabe. Grundlage dafür bot die quantitative Evaluation der Knorpel- und der Knochenreparatur mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie und Mikro-Computertomographie. Nach drei Wochen Behandlung mit durch elektrischen Puls gesteuertem Gentransfer waren die $\text{TNF}\alpha$ -Levels in den Gruppen mit der entzündungshemmenden Therapie und dem Tetracyclinpromotor vermindert. Begleitend wurde ein Ansteigen der Knorpeldicke und ein Abnehmen im spezifischen Knorpelvolumen festgestellt, was durch histologische Untersuchungen bestätigt wurde. Allerdings wurde kein signifikantes Wiederherstellen der Knochenarchitektur festgestellt, das in gesunden Knorpelgelenken mit dieser Behandlung erfolgen würde.